

Evaluierung von bioresorbierbaren Stents zur Verhinderung der Neoatherosklerose

von Anna Bulin

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

**Evaluierung
von bioresorbierbaren Stents
zur Verhinderung der Neoatherosklerose**

von Anna Bulin

aus Lauf an der Pegnitz

München 2019

**Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Angefertigt am: Deutschen Herzzentrum München, Klinik der Technischen Universität
München

und

am Zentrum für Präklinische Forschung, Fakultät für Medizin, Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München

Mentoren: Prof. Dr. Michael Joner und PD Dr. Christine Baumgartner

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Tag der Promotion: 25. Februar 2019

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	4
1	Gefäßaufbau	4
1.1	Endothel.....	6
2	Atherosklerose.....	8
2.1	Risikofaktoren	9
2.2	Pathogenese	9
2.3	Symptome.....	14
2.4	Diagnose und Therapie	15
2.4.1	Perkutane Koronarintervention (PCI)	17
2.4.1.1	Stents.....	18
2.4.1.1.1.	Bare Metal Stents (BMS)	19
2.4.1.1.2.	Drug Eluting Stents (DES)	19
2.4.1.1.3.	Bioresorbierbare Stents (BRS).....	21
2.4.1.2	Optische Kohärenztomographie (OCT)	25
2.4.2	Statintherapie	26
3	Neoatheroklerose	28
3.1	Abgrenzung.....	29
3.2	Pathogenese	30
3.3	Therapie	32
4	Atherosklerotische und neoatherosklerotische Tiermodelle.....	33
4.1	Mäuse	35
4.2	Schweine	36
4.3	Kaninchen	37
III	ZIELSETZUNG	42
1	BRS und Neoatherosklerose	42
2	Statin-Therapie und Neoatherosklerose	43
IV	MATERIAL UND METHODEN.....	44
1	Material	44
1.1	Versuchstiere	44
1.1.1	Kaninchen.....	44
1.1.2	Kaninchenhaltung	44
1.1.3	Spezialfutter	45
1.2	Medikamente.....	46
1.3	Verbrauchsmaterial	47

1.4	Geräte	48
1.5	Stents	49
2	Methoden	50
2.1	Überblick über das neoatherosklerotische Kaninchenmodell	50
2.1.1	Dokumentation	52
2.2	Blutentnahme und -untersuchungen	53
2.2.1	Blutentnahmen	53
2.2.2	Blutuntersuchungen.....	55
2.3	OP-Vorbereitung.....	55
2.4	Anästhesieprotokolle	56
2.4.1	Propofol-Narkose	56
2.4.2	Medetomidin/S-Ketamin-Narkose.....	57
2.5	Operation 1: Denudation und Stent-Implantation	57
2.6	Operation 2: Denudation	63
2.7	Post-operatives Management	64
2.8	Gruppeneinteilung und Randomisierung	65
2.9	Atorvastatin-Therapie vs. Placebo.....	65
2.10	Finaler Eingriff und Euthanasie.....	66
2.11	Optical Coherence Tomography (OCT)	67
2.12	Probenentnahme post-mortem	68
2.13	Probenaufbereitung.....	70
2.14	Analyse der OCT-Untersuchungen.....	71
2.14.1	Morphometrie in den OCT-pullbacks.....	71
2.14.2	Neoatherosklerose-Score in den OCT-pullbacks.....	71
2.15	Analyse der histologischen Schnitte	71
2.15.1	Morphometrie in den histologischen Schnitten	72
2.15.2	Semi-quantitative Auswertung der histologischen Schnitte ..	73
2.15.3	Neoatherosklerose-Score in den histologischen Schnitten	75
2.16	Statistische Analyse	77
V	ERGEBNISSE	79
1	Gewichtsentwicklung.....	79
2	Blutuntersuchungen und Gruppeneinteilung	79
3	Ausfälle	81
4	Atorvastatin-Therapie.....	82
5	„baseline“-Werte der Gruppe 1	83
5.1	Untersuchung der OCT-pullbacks	83
5.1.1	Morphometrie in den OCT-pullbacks.....	84
5.1.2	OCT-Neoatherosklerose-Score in den OCT-pullbacks.....	85
5.2	Untersuchung der histologischen Schnitte.....	85

5.2.1	Morphometrie in den histologischen Schnitten	85
5.2.2	Semi-quantitative Auswertung der histologischen Schnitte ..	86
5.2.3	Neoatherosklerose-Score in den histologischen Schnitten	88
6	Werte der Gruppen 2 und 3	88
6.1	Untersuchung der OCT- <i>pullbacks</i>	88
6.1.1	Morphometrie in den OCT- <i>pullbacks</i>	89
6.1.2	OCT-Neoatherosklerose-Score in den OCT- <i>pullbacks</i>	90
6.2	Untersuchung der histologischen Schnitte.....	91
6.2.1	Morphometrie in den histologischen Schnitten	91
6.2.2	Semi-quantitative Auswertung der histologischen Schnitte ..	95
6.2.3	Neoatherosklerose-Score in den histologischen Schnitten	97
6.2.4	Qualitative Beschreibung der histologischen Schnitten	98
VI	DISKUSSION	100
1	Ergebnisse aus Gruppe 1	101
2	Ergebnisse der Statintherapie	102
3	Neoatherosklerose-Scoring in Histologie und OCT	103
4	Die Ergebnisse des BRS	104
5	Limitationen.....	109
VII	ZUSAMMENFASSUNG	111
VIII	SUMMARY	113
IX	LITERATURVERZEICHNIS.....	115
X	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
XI	TABELLENVERZEICHNIS	134
XII	ANHANG	135
1	Anhang 1: 1%iges Cholesterinfutter	135
2	Anhang 2: 0,025%iges Cholesterinfutter	136
3	Anhang 3: Aufzeichnungsplan Tierversuch	137
4	Anhang 4: Dokumentation Cholesterinfütterung	138
5	Anhang 5: Score Sheet.....	139
6	Anhang 6: OP-Protokoll	141
7	Anhang 7: Implantationsmatrix	142
8	Anhang 8: Blutwerte	143
XIII	DANKSAGUNG	152

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie	GLMM	Generalized Linear Mixed Models
ACS	Akutes Koronarsyndrom	γ -GT	gamma-Glutamyltransferase
AHA	American Heart Association	HDL	High Density Lipoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase	HE	Hämatoxylin-Eosin
apoE	Apolipoprotein E	HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
AST	Aspartat-Aminotransferase	IEL	Lamina elastica interna
atm	Physikalische Atmosphäre/Atmosphärendruck	IPH	Intraplaque hemorrhage
AUC	Area under the Curve	ISR	In-Stent Restenose
BMS	Bare Metal Stent (unbeschichteter Metallstent)	KGW	Körpergewicht
BRS	Bioresorbierbarer Stent	KHK	Koronare Herzkrankheit
CAM	cell adhesion molecule	LD	Lipid droplet
CI	Konfidenzintervall	LDL	Low-density Lipoprotein
DAPT	Duale Anti-Plättchen Therapie	LDLR	LDL-Rezeptor
DM	Diabetes mellitus	LIA	Linke Iliakalarterie
DES	Drug Eluting Stent (medikamenten-beschichteter Metallstent)	LLL	Late Lumen Loss
EC	Endothelzelle	Mg	Magnesium
EEL	Lamina elastica externa	mTOR	mammalian target of rapamycin
GEE	Generalized Estimating Equations	NIH	Neointimahyperplasie
GLDH	Glutamatdehydrogenase	NO	Stickstoffmonoxid

NSTEMI	Nicht-STEMI	VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells/ glatte Gefäßmuskelzellen
NZW	New Zealand White	VVG	Verhoeff-Van-Gieson
OCT	Optische Kohärenztomographie	VVK	Venenverweilkatheter
oxLDL	Oxidiertes LDL	WHHL	Watanabe Heritable Hyperlipidemic
PCI	Perkutane Koronarintervention	WHO	World Health Organization
PLLA	poly-L-lactic-acid	ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie		
RIA	Rechte Iliakalarterie		
ROS	Reactive oxygen species		
ScT	Scaffold-Thrombose		
SD	Standardabweichung		
SEM	Scanning electron microscopy		
SGS	Serumgallensäuren		
SOP	Standard Operation Procedure		
ST	Stentthrombose		
STEMI	ST-Hebungs-Myokardinfarkt		
TCFA	Thin-cap fibroatheroma		
TLF	Target lesion failure		
TLR	Target lesion revascularisation		
TSchG	Tierschutzgesetz		
TVA	Tierversuchsantrag		
VLDL	Very low-density lipoprotein		
VLST	Very late stent thrombosis		
VLScT	Very late scaffold thrombosis		

I EINLEITUNG

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zu denen auch die Neoatherosklerose zählt, stellen einen Krankheitskomplex mit enormem Ausmaß dar. Im Jahr 2013 fanden 17,3 Millionen Menschen weltweit durch Erkrankungen des Herzens und der Gefäße den Tod, 4 Millionen davon in Europa. Das sind 45% aller Todesfälle¹. Krankheiten der Koronargefäße stellen die führende Todesursache in Deutschland², Europa³ und der Welt⁴ dar. Die Belastungen des Gesundheitssystems durch kardiovaskuläre Erkrankungen sind hoch: in der EU summieren sich direkte und indirekte Kosten pro Jahr auf 210 Milliarden Euro³. In Deutschland belaufen sich die Kosten auf 37 Milliarden Euro, der größte Anteil davon entfällt auf die Koronare Herzkrankheit (KHK). Damit verursachen Herz-Kreislauf-Erkrankungen mehr Kosten als jeder andere Krankheitskomplex².

Bei der Atherosklerose, als bedeutendster Manifestation von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, handelt es sich um ein chronisch-entzündliches Geschehen in der Gefäßwand. Betreffen diese Veränderungen die Koronarien, spricht man von KHK. Durch das Eindringen von Cholesterin und Entzündungszellen entstehen atherosklerotische Ablagerungen, welche auch als Plaques bezeichnet werden. Zunächst besteht der Plaque vor allem aus Cholesterin, Entzündungs- und glatten Muskelzellen. Fortgeschrittene Veränderungen weisen nekrotische Areale, Cholesterinkristalle und Kalzifizierungen auf. Im Laufe von Jahrzehnten schreiten diese Veränderungen zunächst klinisch stumm voran, bevor sie letztlich das Gefäßlumen soweit einengen, dass es im Versorgungsgebiet zu Mangelversorgung mit Sauerstoff und damit am Herzmuskel zu Anzeichen von Angina pectoris kommt. Außerdem kann es an der Veränderung zu Oberflächendefekten kommen, man spricht von der sog. Plaqueruptur. Das dabei mit dem Blutstrom in Berührung kommende Material ist hochgradig thrombogen, das entstehende Gerinnsel kann den Blutfluss schnell verschließen und so zum akuten Herzinfarkt oder im schlimmsten Fall zum plötzlichen Herztod führen.

Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte bei der Erforschung der Atherosklerose gemacht wurden, sind längst nicht alle Zusammenhänge geklärt. Im Rahmen von Verbesserungen der Therapiemöglichkeiten treten immer wieder neue Komplikationen auf, die zunächst erforscht werden müssen, bevor ihnen angemessen begegnet werden kann. So stellte die Implantation des ersten Metallstents (BMS, *bare metal stent*) im Jahre 1986 einen

revolutionären Fortschritt bei der Behandlung von durch atherosklerotische Plaques verengten Koronarien dar⁵. Bald stellte man jedoch fest, dass in bis zu 30% der so therapierten Gefäße ein erneuter Verschluss des Lumens auftrat. Diese Restenose war auf starke Proliferationsvorgänge innerhalb des Stents zurückzuführen⁶. Mit der Entwicklung von Stents, die antiproliferative Medikamente freisetzen, den sogenannten Medikamenten-beschichteten Stents (*drug-eluting stents*, DES), konnte diese Komplikation nach Stentimplantation drastisch reduziert werden⁷. Auch diese technologische Verbesserung führte zu neuen Komplikationen.

Zu diesen zählt auch die Neoatherosklerose, eine Manifestationsform der Atherosklerose in einem bereits implantierten Stent. Gewebe, welches den Stent nach der Implantation überzieht und vom Blutstrom abschirmt, die Neointima, entwickelt erneut Veränderungen in Form von atherosklerotischen Ablagerungen. Im Gegensatz zu Atherosklerose entsteht Neoatherosklerose jedoch nicht im Laufe von Jahrzehnten, sondern innerhalb von Monaten nach Stentimplantation. Es kommt in der neugebildeten Neointima wiederum zur Ansammlung von Cholesterin und Entzündungszellen. Auch neoatherosklerotische Läsionen können sich zu fortgeschrittenen Veränderungen mit nekrotischem Kern entwickeln. Diese schnell voranschreitenden neoatherosklerotischen Veränderungen bergen ein besonderes Risiko für Plaquerupturen mit nachfolgendem thrombotischen Verschluss des Gefäßes und Herzinfarkt. Zwar kann sich auch in BMS Neoatherosklerose entwickeln, in DES treten diese Veränderungen jedoch deutlich früher und ausgeprägter auf⁸. Dies führt dazu, dass ein bestimmter Anteil von Patienten nach DES Implantation dem stetig zunehmenden Risiko einer erneuten Plaqueruptur ausgesetzt ist, während eine verlässliche Risikostratifizierung derer, die zur erneuten Plaqueruptur neigen, derzeit noch nicht möglich erscheint. Darüber hinaus macht der Blick auf die hohe Zahl an DES, die weltweit implantiert werden, die oft verheerenden Folgen einer Plaqueruptur und die begrenzten Therapiemöglichkeiten deutlich, dass die Neoatherosklerose ein wichtiges Forschungsfeld ist. Präklinische Studien sind nötig, um die Zusammenhänge, die zur Entstehung von Neoatherosklerose führen, zu verstehen und neue Herangehensweisen zu evaluieren.

Wieso Neoatherosklerose in permanenten Stents und insbesondere in DES auftritt, ist immer noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet jedoch, dass der Metallkäfig des Stents die physiologischen Funktionen des Gefäßes beeinträchtigt. Im DES führt zudem das abgegebene Medikament zu einer gestörten Endothelialisierung⁹. Jüngste Fortschritte in der

Stentgeschichte haben zur Entwicklung vollständig bioresorbierbarer Stents (BRS) geführt. Noch befindet sich diese Technologie in einer sehr frühen Phase der klinischen Evaluation, auch wenn mittlerweile mehrere Devices für den Einsatz im Menschen zugelassen sind. Von BRS erhofft man sich eine Reihe von Vorteilen gegenüber permanenten Stents, darunter auch eine positive Auswirkung auf die Neoatheroskleroseformation¹⁰.

Die hier verwendete Studie diene der Evaluierung dieser Hypothese unter Verwendung eines bioresorbierbaren Magnesium-Stents. Dazu wurde dieser BRS (Magmaris®, Biotronik AG, Bülach, Schweiz) in einem neoatherosklerotischen Kaninchenmodell gegen einen speziell angefertigten, baugleichen DES verglichen. Der Einsatz eines BRS zur Verhinderung von Neoatherosklerose stellt damit eine potenzielle Sekundärprävention dar. Zusätzlich wurde Placebo-kontrolliert ein Statin eingesetzt, um zu ermitteln, ob dieser Cholesterinsenker sich positiv auf die Neoatherosklerose auswirkt. Das Ausmaß von neoatherosklerotischen Veränderungen wurde in histologischen Schnitten und mittels eines neuartigen Bildgebungsverfahrens, der OCT (Optische Kohärenztomographie), analysiert und über zwei Score-Systeme erfasst.

Im Folgenden wird zunächst der aktuelle Stand der Literatur zu den für die Arbeit relevanten Themen vorgestellt, bevor das angewandte Kaninchenmodell und die resultierenden Ergebnisse präsentiert werden.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Gefäßaufbau

In allen Gefäßen des Körpers herrscht ein dreischichtiger Wandbau, der jedoch in den Venen nicht so stark ausgeprägt ist. Die Gefäßwand besteht von innen nach außen aus¹¹:

- (Tunica) Intima
- (Tunica) Media
- (Tunica) Adventitia

Die Intima besteht aus einer einschichtigen Lage von Endothelzellen (*endothelial cells*, ECs) auf einer dünnen Basalmembran und subendotheliale Bindegewebe (Stratum subendotheliale)¹². Darunter finden sich die überwiegend ringförmig angeordneten Strukturen der Media mit glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs), elastischen und kollagenen Fasern¹³. Die Adventitia besteht aus lockerem Bindegewebe mit Kollagenfasern und elastischen Fasern. Sie führt längs zum Gefäß laufende vegetative Nerven für die Gefäßinnervation. Bei größeren Arterien mit entsprechend dicker Wand außerdem auch vasa vasorum für die Blutversorgung¹⁴. Kleinere Gefäße und die inneren Bereiche größerer Arterien werden durch Diffusion aus dem Lumen versorgt¹¹. Die Intima wird von der Media durch die Lamina elastica interna (IEL) abgegrenzt, die Media von der Adventitia durch die Lamina elastica externa (EEL). Dabei handelt es sich um geregelt angeordnete elastische Faserstrukturen, die jedoch nur bei Arterien vom muskulären Typ gut erkennbar sind¹² (vgl. **Abbildung 1**).

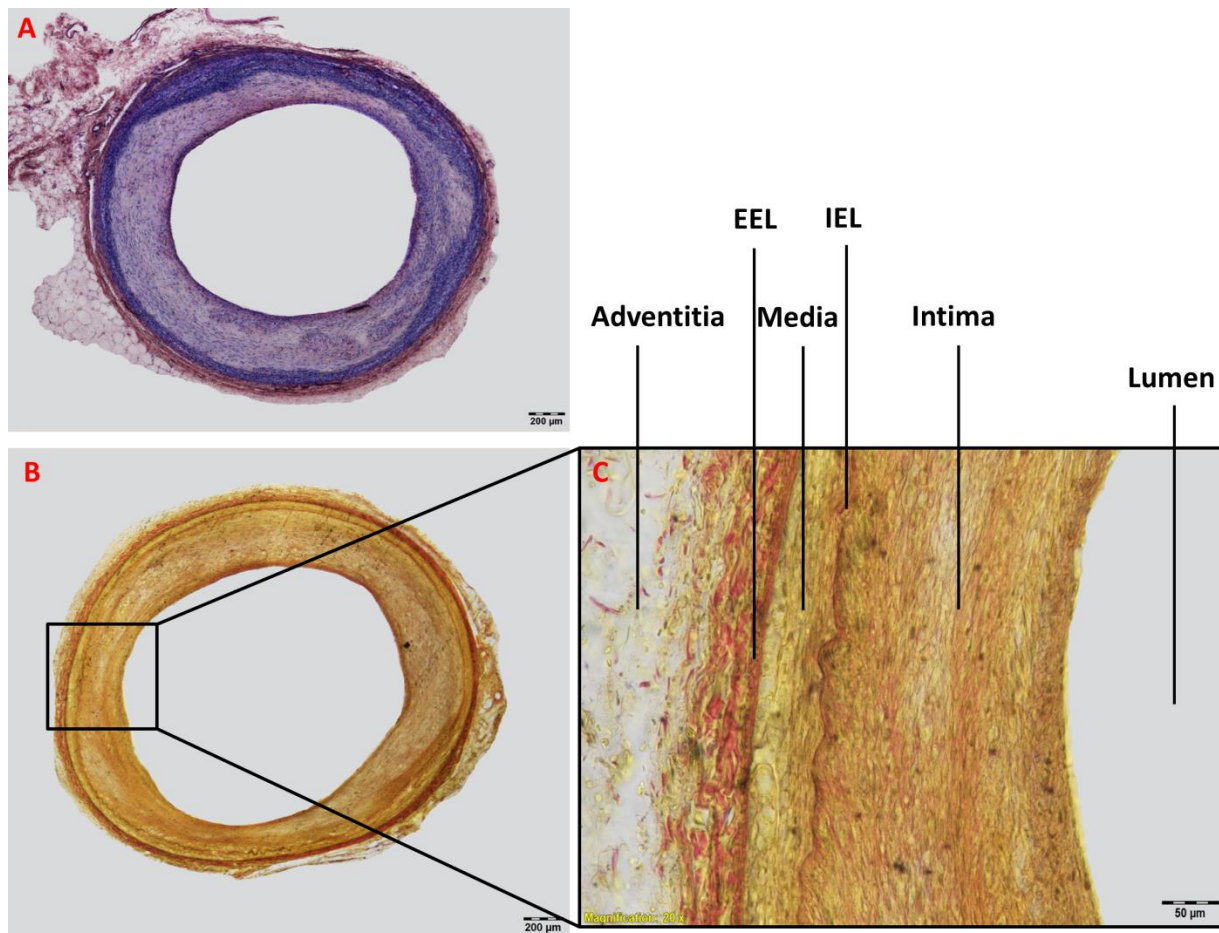


Abbildung 1: Gefäßaufbau

Abbildung 1A zeigt einen HE-gefärbten, 1B einen VVG-gefärbten Gefäßquerschnitt. Bei 1C handelt es sich um eine Vergrößerung aus dem Gefäßwandbereich, auf welcher die verschiedenen Schichten des Wandbaus deutlich zu erkennen sind. Bei den dargestellten Gefäßen handelt es sich um Kaninchengefäße, welche bei der durchgeführten Studie gewonnen wurden. Im Rahmen der operativen Eingriffe mit Denudation der Arterien treten auch in den ungestenteten Gefäßabschnitten Veränderungen auf, so weist die Intima eine unphysiologische Dicke auf. HE = Hämatoxylin-Eosin, VVG = Verhoeff-Van-Gieson, EEL = Lamina elastica externa, IEL = Lamina elastica interna.

Die Funktion der Intima besteht im kontrollierten Austausch von Gasen und Molekülen zwischen Lumen, Gefäßwand und Interstitium¹². Auf die vielfältigen Funktionen der ECs soll unter 1.1 näher eingegangen werden.

Je nach Entwicklung der Media unterscheidet man Arterien vom muskulären und elastischen Typ. Zu den Arterien des elastischen Typs zählen die Aorta und die großen von ihr abzweigenden Gefäße (A.subclavia, A.brachiocephalica, A.carotis communis, A.iliaca communis, Truncus und A.pulmonalis)¹⁵. Dieser Arterientyp ist dadurch gekennzeichnet, dass er den mit der Herzaktion verbundenen Druckunterschied aushalten und ausgleichen muss und dabei die herznah noch diskontinuierliche Strömung in eine kontinuierlichere Strömung umwandelt

(Windkesselfunktion)¹⁵. Deshalb enthält die Media vor allem dicht gepackte Bündel elastischer Fasern zwischen den VSMCs, dazwischen Proteoglykan-reiche Grundsubstanz¹². Die anderen Arterien des Kreislaufs sind vom muskulären Typ, wobei der Übergang zwischen den beiden Arterientypen fließend ist¹¹. Die Media der Arterien vom muskulären Typ enthält dicke Bündel zirkulärer VSMCs, dazwischen einzelne elastische Fasern und Proteoglykane¹⁵. Die ausgeprägte Ringmuskulatur erlaubt über Vasomotion eine kontrollierte Durchblutung des Versorgungsgebiets¹¹.

Vermittelt wird die Vasomotion, also die bedarfsangepasste Vasodilatation und –konstriktion, jedoch durch das Endothel, was nur eine von vielen Funktionen dieses Zellverbandes ist¹⁶.

1.1 Endothel

Das Endothel kleidet das gesamte kardiovaskuläre System aus, vom Herz und seinen Klappen bis hin zu den kleinsten Kapillaren. Der über die endotheliale Barriere erfolgende Stoffaustausch unterscheidet sich dabei stark. Das Endothel ist daran angepasst unterschiedlich entwickelt, man spricht von der Heterogenität der ECs¹⁷. Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf den von Atherosklerose (und damit auch Neoatherosklerose) betroffenen Arterien, insbesondere den Koronarien. Diese weisen ein kontinuierliches, ungefenstertes Endothel auf¹⁸. Die einzelnen Zellen sind ellipsoid und entlang des Blutstroms ausgerichtet¹⁹.

Unter physiologischen Bedingungen sind die Zellen des Endothels zwar hoch stoffwechsel-aktiv, sie teilen sich jedoch nur selten²⁰. Aus diesem „Ruhezustand“ können die Zellen schnell in einen mitotisch aktiven Zustand wechseln, um Verletzungen zu schließen oder Gefäße neu zu bilden^{17,20}. ECs reagieren auf biochemische Trigger in Form von auto-, para- und endokrinen Stimuli. Außerdem können sich auch biomechanische Einflüsse, ausgelöst v. a. durch den Blutfluss, auf das Endothel auswirken¹⁹. So weiß man heute, dass ECs in Gefäßbereichen mit verändertem Blutfluss eine andere Gestalt haben als oben beschrieben. Statt einer eher länglichen Morphologie mit geregelter Anordnung entlang des laminaren Blutflusses, erinnern ECs in Bereichen mit verändertem Fluss an ein Kopfsteinpflaster (vgl. **Abbildung 2** unter 2.2 Pathogenese)¹⁸.

Das Endothel hat eine Reihe von Funktionen^{16,21}:

- Semipermeable Barriere zwischen Blut und Gewebe
- Beteiligung an der Hämostase
- Beteiligung an inflammatorischen Prozessen
- Vermittlung der Vasomotion

Die ECs sind untereinander eng durch sog. *tight junctions* verknüpft und bilden so eine semipermeable Barriere zwischen Lumen und Gewebe¹⁸. Über die *tight junctions* wird der Durchtritt von im Blut gelösten Substanzen zwischen den Endothelzellen abhängig von Größe und Ladung der Moleküle kontrolliert²². Bei Makromolekülen (z. B. Cholesterin) spielt außerdem die Konzentration im Serum eine Rolle¹⁶.

Das Endothel ist des Weiteren für die Vermittlung der Hämostase von großer Bedeutung. Ein gesundes Endothel hält das sensible Gleichgewicht zwischen physiologisch antithrombotischem und, bei Verletzung, prothrombotischem Milieu aufrecht. Auch bei einer Verletzung wird die Gerinnung auf betroffene Areale beschränkt²³. Im Ruhezustand bilden die ECs u. a. die antithrombotisch wirkende Substanz Stickstoffmonoxid (NO). Prothrombotische Substanzen werden bei Bedarf frei¹⁸.

Auch im Rahmen von Entzündungsreaktionen kommt dem Endothel eine wichtige Funktion zu: es reagiert auf Zytokine mit der Sekretion von P-Selektin aus den vorgeformten Weibel-Palade-Körperchen¹⁸. Bei P-Selektin handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül (*cell adhesion molecule*, CAM), welches nach Aktivierung der ECs auf der luminalen Oberfläche präsentiert wird²⁴. Es interagiert mit Rezeptoren auf Leukozyten und löst so zunächst das „rolling“ von Entzündungszellen am Endothel aus. Dieser Vorgang aktiviert Integrine auf der Leukozyten-Oberfläche, diese gehen eine feste Bindung mit CAMs ein und vermitteln so die Adhäsion. Die eigentliche Diapedese über die endotheliale Barriere hinweg erfolgt größtenteils parazellulär. Auf diese Weise löst die Bindung zwischen EC und Leukozyt einen Anstieg an Ca^{2+} in der EC aus. Darüber werden Aktin-Filamente aktiviert, *junctions* geöffnet und die Passage der Leukozyten aus dem Lumen ins Gewebe ermöglicht^{24,25}.

Als letzte wichtige Funktion sind die ECs in besonderem Maße an der Vasomotion beteiligt. Dazu setzt das Endothel Vasodilatoren und konstriktoren frei. NO ist der potenteste Vasodilatator¹⁸.

Es wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase produziert, wenn die ECs bestimmten Stimuli ausgesetzt sind. Dazu zählen z. B. Scherstress und Acetylcholin²⁶. NO ist ein hochflüchtiges Gas und diffundiert schnell durch die Zelle. Durch Bindung an VSMCs löst es eine Vasodilatation aus. Gleichzeitig unterdrückt es unter physiologischen Bedingungen die Wirkung endothelialer Vasokonstriktoren²⁷ und erhält dadurch bei gesundem Endothel einen basalen Tonus der glatten Gefäßmuskulatur¹⁸. Darüber hinaus hat NO noch weitere Funktionen. Diffundiert es ins Blut, wirkt es antithrombotisch²⁶, verhindert die Adhäsion von Leukozyten und die Proliferation von VSMCs¹⁷.

Das Endothel ist ein komplexes Themenfeld, bei dessen Erforschung in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht wurden. Im Rahmen dieser Arbeit kann es lediglich angeschnitten werden. Es ist an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt. Störungen des sensiblen endothelialen Gleichgewichts sind das Schlüsselereignis der Pathogenese dieser Erkrankung, auf die nun im Folgenden genauer eingegangen werden soll²⁸.

2 Atherosklerose

Bei Atherosklerose handelt es sich um eine chronisch-inflammatorische Reaktion der Gefäßwand, die progressiv voranschreitet. Sie ist durch die zunehmende Akkumulation von Lipiden und Entzündungszellen in der Intima gekennzeichnet, ein Vorgang, den man als Plaquebildung bezeichnet^{29,30}. Durch die Vergrößerung der atherosklerotischen Läsion nimmt das Lumen des Gefäßes und damit die Perfusion des Herzmuskels ab, Brustschmerz (Angina pectoris) ist die Folge. Komplikationen wie Plaqueruptur mit Thrombusbildung können durch schnellen und hochgradigen Verschluss des Koronargefäßes zu Herzinfarkt und im schlimmsten Fall zu plötzlichem Herztod führen. Veränderungen der Koronarien durch Atherosklerose werden mit dem Begriff KHK bezeichnet. Auch andere Gefäße können jedoch atherosklerotische Veränderungen entwickeln. Man spricht von peripherer arterieller Verschlusskrankheit, wenn die Arterien der Gliedmaßen betroffen sind und von zerebraler Atherosklerose, wenn Arterien des Gehirns Plaques entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf den durch Atherosklerose hervorgerufenen Veränderungen der Herzkranzgefäße.

2.1 Risikofaktoren

Eine Reihe von Faktoren wird mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Atherosklerose in Verbindung gebracht. Einige Risikofaktoren stehen in Zusammenhang mit einem ungesunden Lebenswandel, darunter Rauchen, mangelnde Bewegung, Ernährungsgewohnheiten und Übergewicht. Außerdem haben Patienten mit Diabetes mellitus, Hypertonie und chronischem Nierenversagen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Auch eine genetische Disposition spielt in manchen Familien eine Rolle³¹.

Immer noch ist nicht für alle Risikofaktoren geklärt, wie diese zur Progression atherosklerotischer Läsionen beitragen. Z. B. ist Rauchen zwar unbestreitbar mit einem deutlich erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse verknüpft, die genauen Mechanismen sind jedoch immer noch nicht vollständig geklärt³². Man geht heute davon aus, dass nicht das Nikotin das Hauptproblem ist, sondern freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), die der Raucher direkt mit dem Zigarettenrauch aufnimmt. Außerdem bewirkt der Zigarettenkonsum eine proinflammatorische Reaktion des Organismus mit vermehrter ROS-Freisetzung durch aktivierte Makrophagen. Die erhöhte Zahl an ROS-Spezies reduzieren die Bioverfügbarkeit von NO, einem potenten Vasodilatator, und erhöhen den oxidativen Stress auf die Endothelzellen. Infolgedessen induziert Rauchen ein proinflammatorisches Milieu mit Aktivierung von Entzündungszellen, gesteigerter Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel und vermehrtem Eindringen von Entzündungszellen in die subendotheliale Matrix³².

Auch zwischen anderen Risikofaktoren und der Entstehung von Atherosklerose scheinen solche Störungen der normalen endothelialen Funktion das Bindeglied zu bilden. Diabetes, Bluthochdruck und Hypercholesterinämie bewirken ebenfalls die vermehrte Bildung von ROS und bedingen dadurch erhöhten oxidativen Stress auf das Endothel^{26,33}.

2.2 Pathogenese

Letztlich stören so viele Risikofaktoren die physiologische Funktion des Endothels und resultieren in der sogenannten Endothelialen Dysfunktion. Dieser Schädigung des Endothels kommt eine initiale Schlüsselrolle bei der Atheroskleroseentstehung zu^{27,34}. Mit dem Begriff Endotheliale Dysfunktion beschreibt man einen Zustand des Endothels, in dem NO entweder nicht mehr ausreichend gebildet wird oder nicht mehr bioverfügbar ist³³. Es resultiert ein von

Vasokonstriktion geprägter Gefäßzustand, der zu weiteren Veränderungen im Sinne einer „Aktivierung“ des Endothels führt²⁸. Darunter versteht man einen proinflammatorischen, prothrombotischen und prokoagulativen Zustand des Endothels mit vermehrter endothelialer Durchlässigkeit, gesteigerter Ausbildung von Adhäsionsmolekülen, Anlagerung und Einwanderung von Entzündungszellen, angeregter Proliferation von VSMCs und Bildung von Zytokinen^{26–28}.

Die Lokalisation des Plaques: Unabhängig vom Einfluss von Risikofaktoren entstehen atherosklerotische Plaques an bestimmten Stellen des Koronarbaums bevorzugt, wofür man mechanische Kräfte verantwortlich macht^{35,36}. Man bezeichnet diese Lokalisationen als „Atherosklerose-anfällig“ oder *progression prone regions*, also Regionen, die dazu neigen, fortschreitende atherosklerotische Veränderungen zu entwickeln³⁵. Dazu zählen Gabelungen, Abzweigungen und Biegungen³⁷. In diesen Bereichen wird der laminare Blutstrom gestört, es treten Veränderungen beim Scherstress auf, die Strömungsgeschwindigkeit sinkt³⁸. Die ECs reagieren auch auf diese veränderten Bedingungen mit Aktivierung. Sie verlieren ihre physiologische Form und Anordnung, produzieren weniger NO, dafür mehr Adhäsionsmoleküle und proinflammatorische Zytokine. **Abbildung 2** zeigt die veränderte Anordnung von Endothelzellen bei Störungen des laminaren Blutflusses. Diese Veränderungen bedingen die Immigration von Leukozyten in die subendotheliale Matrix und stimulieren die Proliferation von VSMCs^{37,39}. Die reduzierte Strömungsgeschwindigkeit führt zu einer längeren Verweildauer von Blutbestandteilen am Endothel, sodass deren Eindringen in subendotheliales Gewebe erleichtert ist³⁸.

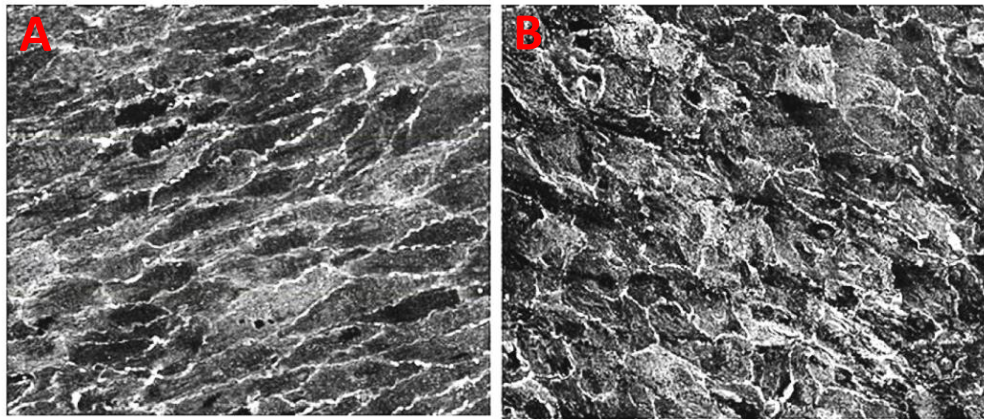


Abbildung 2: Endothel in „Atherosklerose-resistenten“ und „-anfälligen“ Gefäßen

En face-Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop. Abbildung 2A zeigt die Aufsicht auf das Endothel in einem „Atherosklerose-resistenten“ Gefäßbereich bei laminarer Strömung mit länglicher Morphologie der ECs. In 2B ist das Kopfsteinpflaster-artige Erscheinungsbild der ECs in „Atherosklerose-anfälligen“ Bereichen des Gefäßbaums erkennbar.

Figure "reprinted from "Gimbrone, Michael A.; García-Cardena, Guillermo (2013): Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. In: Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology, Vol. 22, Issue 1, p.9-15" with permission from Elsevier."

Die Entstehung von Lipidkern und fibröser Kappe: Auch LDL-Partikel (*low density lipoprotein*) können das Endothel überwinden und in die Intima diffundieren. Erhöhte Plasmaspiegel führen dabei zu einer ausgeprägteren LDL-Akkumulation in der subendothelialen Matrix³⁹. Natives LDL führt dort jedoch nicht zu der für die Atherosklerose typischen initialen Entzündungsreaktion. Erst oxidierte Phospholipide (oxLDL) wirken proinflammatorisch und bewirken ihrerseits eine weitere Aktivierung des Endothels mit zunehmender Ausbildung von Adhäsionsmolekülen⁴⁰. Sie wirken chemotaktisch auf Monozyten, welche im Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzieren und das oxLDL phagozytieren. Die Makrophagen nehmen die veränderten Lipoproteine vor allem über den sog. *scavenger receptor pathway* auf³⁵. Entscheidend für diesen *pathway* ist ein fehlender negativer Feedback-Mechanismus, sodass die Lipidaufnahme unkontrolliert abläuft⁴¹. Das Cholesterin wird im Makrophagen in *lipid droplets* (LDs) gespeichert und ergibt das schaumige Erscheinungsbild und ihre Bezeichnung als *foam cells*⁴⁰.

Die fortschreitende Akkumulation von LDs schädigt die Schaumzellen zunehmend. Letztlich resultiert der Zelltod, wobei im Plaque sowohl Apoptose als auch Nekrose beteiligt sind⁴². Dabei werden die in den Makrophagen enthaltenen Lipide und nekrotisches Material freigesetzt, die

Ansammlung von Lipiden und Zellresten in der Intima nimmt immer weiter zu. Es kommt zu einem Zusammenlaufen in sogenannten *lipid pools* und schließlich zum *lipid core*. Dieses drängt zunehmend die Strukturen der Intima auseinander⁴³. Außerdem wirkt der Lipidkern auch als Trigger für die Bildung von Reparationsgewebe in Form von faserreichem Bindegewebe⁴³. Maßgeblich an dieser bindegewebigen Reaktion beteiligt sind die VSMCs, welche durch verschiedene Stimuli zur Migration, Proliferation und Produktion von Extrazellulärmatrix angeregt werden^{27,44,45}. So entsteht das sog. *fibrous cap*, eine mehr oder weniger dicke, bindegewebige Kappe aus VSMCs, Kollagen, Proteoglykanen und Makrophagen, über den sich zunehmend verändernden Strukturen der Intima⁴⁶.

Stabile Plaques: Obwohl das Voranschreiten atherosklerotischer Veränderungen oft über Jahrzehnte klinisch stumm erfolgt, können auch sog. stabile Plaques - darunter versteht man Plaques mit intakter Kappe, die kein Akutes Koronarsyndrom (ACS) auslösen - Symptome verursachen. Durch Anpassungsreaktionen des Gefäßes während der fortschreitenden Plaqueentwicklung (im Sinne einer kompensatorischen Vergrößerung des Gefäßquerschnitts⁴⁷) kann das Lumen oft eine gewisse Zeit lang konstant gehalten werden^{48,49}. Erst wenn der Plaque mehr als 40% ausmacht, kommt es zu einer Verkleinerung des Lumens^{50,51}. Die resultierende Abnahme des Blutflusses und, insbesondere bei Belastung, die Minderdurchblutung des Myokards kann sich dann klinisch als Angina pectoris manifestieren.

Die Entstehung des nekrotischen Kerns: Bei fortgeschritteneren Plaques entsteht aus dem *lipid core* das *nekrotic core*. Es werden immer mehr Schaumzellen apoptotisch⁵². Die frei werdenden Zellbestandteile verstärken wiederum die Migration von Entzündungszellen in das Gebiet. So resultiert ein Teufelskreis, der dazu führt, dass im Inneren der Läsion ein größer werdender nekrotischer Bereich aus Lipiden, Cholesterinkristallen und Zelltrümmern entsteht, das sog. *nekrotic core*⁴⁰. Im Bereich des nekrotischen Kerns kommt es zu einem Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix⁵³. Typisch für den nekrotischen Kern ist außerdem die weiter zunehmende Ansammlung von zytotoxischem, freiem Cholesterin, welches sich in Standard histologischen Schnitten in Form von leeren Spalten darstellt. Erythrozyten, deren Membranen sehr viel freies Cholesterin enthalten, und welche bei Einblutungen in den Plaque eindringen, sind zusätzliche Quelle für freies Cholesterin⁵⁴.

Die Destabilisierung des Plaques: Dieses *intraplaque hemorrhage* (IPH) kann aus Einblutungen aus dem Lumen und insbesondere aus „undichten“ vasa vasorum entstehen⁵⁴. Durch die extravasierten Erythrozyten kommt nun eine Kaskade in Gang, die eine Destabilisierung des Plaques bewirkt. Die roten Blutkörperchen und insbesondere das in ihren Membranen enthaltene freie Cholesterin und Häm-Eisen wirken als Stimulus für ein Eindringen von Makrophagen in die Gegend. Aus den Makrophagen frei werdende Proteasen schädigen die Zellen der Umgebung und ihre Matrix-Metallo-Proteasen degradieren das Kollagen der stabilisierenden Extrazellulärmatrix⁴⁸. Durch diese Vorgänge nimmt die Dicke der fibrösen Kappe über dem nekrotischen Kern ab, die Plaqueinstabilität und damit die Gefahr einer Plaqueruptur steigt^{42,49}. So führen die Veränderungen zur Entwicklung von sog. *vulnerable plaques* (oder *thin-cap fibroatheroma*, TCFA), also Plaques, die nur noch von einer sehr dünnen, anfälligen Kappe vom Blutstrom getrennt sind⁵⁵. Durch IPH lässt sich auch erklären, wieso manchmal ein plötzlich starker Anstieg der Instabilität auftritt, nachdem die Läsionen zuvor lange Zeit konstant waren⁵⁶. Sluimer und Kollegen konnten zwischen dem Ausmaß der Neovaskularisation durch vasa vasorum und dem Voranschreiten der atherosklerotischen Läsionen eine starke Korrelation nachweisen⁵⁷.

Oberflächendefekte und Thrombusbildung: Gerade wenn das Gewebe über dem Plaque dünn und die Kappe durch Umbauvorgänge geschwächt ist, ist die Gefahr für Oberflächendefekte des *fibrous caps* besonders hoch⁴³. Risse treten dabei besonders häufig an den Schulterregionen des Plaques auf, weil hier die stärkste mechanische Beanspruchung, die höchste Dichte an Schaumzellen und dadurch die stärkste Konzentration an Matrix-Metallo-Proteinasen auftritt^{39,48}. Infolge der Oberflächendefekte werden stark thrombogene Strukturen des Plaques freigelegt, an diesen kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems und zur Thrombusbildung. Neben den beschriebenen Vorgängen bei der Plaqueruptur kann es auch durch Plaqueerosion und durch das Auftreten kalzifizierter Knötchen zur Entstehung von Thrombosen kommen⁴⁶. Bei der Erosion ist nicht die Ruptur der fibrösen Kappe ursächlich für die Thrombose. Stattdessen liegen großflächige Defekte des Endothels vor, sodass Blutbestandteile mit den darunterliegenden intimalen Strukturen in Kontakt kommen. Kalzifizierte Knötchen finden sich an der Lumenfläche von fibrösen Kappen. Ihr Auftreten wird insbesondere an geheilten Rupturen beobachtet⁴⁶. Führt einer der Vorgänge zur Entstehung eines Thrombus, können schnell große, Lumen-verschließende Thromben und akute Symptome

(ACS) auftreten. Genauso ist jedoch auch ein langsames Voranschreiten der Thrombose möglich.

Kalzifikationen: Ein weiteres Charakteristikum atherosklerotischer Plaques sind Kalzifizierungen. Bereits in frühen Stadien der Atherosklerose können diese zunächst als Mikrokalzifikation nachgewiesen werden, welche dann zu großen Kalzifikationen zusammenlaufen⁵⁴. Obwohl das Ausmaß der vaskulären Kalzifizierung negativ mit der Prognose verknüpft ist, konnten Huang et al. in ihrer Untersuchung zeigen, dass dies nicht auf eine Destabilisierung der Plaques „von innen“, durch Kalziumablagerungen zurückzuführen ist. Vielmehr gehen die Autoren davon aus, dass die Stärke der Kalziumablagerungen ein Gradmesser für das Ausmaß der Atherosklerose ist oder für systemische Faktoren, die ein erhöhtes Risiko bedingen⁵⁸.

2.3 Symptome

Atherosklerose kann zu verschiedenen klinischen Manifestationen führen, abhängig von der Lokalisation des Plaques. So tritt bei Veränderungen der Herzkranzgefäße die KHK auf, bei Plaques in Carotis und Zerebralgefäßen kann sich dagegen ein Schlaganfall entwickeln und bei atherosklerotischen Läsionen in den peripheren Arterien eine Infarzierung der Gliedmaßen. Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf den Veränderungen der Koronarien.

Es vergehen Jahrzehnte, in denen die Veränderungen hier symptomlos voranschreiten. Symptomatisch wird Atherosklerose erst, wenn durch die Läsionen eine so hochgradige Stenosierung des Gefäßes erfolgt, dass im Versorgungsgebiet der Arterie eine Minderperfusion des Herzmuskels resultiert oder es im Rahmen von Plaquerupturen oder -erosionen zur Gerinnselbildung und zum Verschluss des Lumens kommt⁵⁵. Die bei der KHK auftretenden Symptome sind vielfältig. Neben Angina pectoris kann die KHK Symptome wie Dyspnoe und weitere Anzeichen einer Herzinsuffizienz hervorrufen, Arrhythmien verursachen oder klinisch stumm bleiben⁵⁹. Angina pectoris äußert sich als Schmerz-, Druck- oder Engegefühl in der Brust und kann von dort z. B. in die Arme ausstrahlen. Ischämien, die ohne klinische Symptome verlaufen, kommen häufig vor. Sie sind zumeist schwächer und von kürzerer Dauer als solche mit Angina und können nur im Rahmen der kardiologischen Diagnostik aufgedeckt werden⁵⁵.

Wenn die KHK in den akut lebensbedrohlichen Zustand übergeht, spricht man vom ACS, welches durch die Ruptur eines Plaques mit nachfolgender Thrombusbildung und daraus resultierender Myokardischämie ausgelöst wird⁵⁵. Der Patient kann sich mit variierenden Befunden präsentieren. Typisch ist starker retrosternaler Schmerz, der ausstrahlen kann. Zusätzlich können Schwäche, Atemnot, Übelkeit, bis hin zu Symptomen eines kardiogenen Schocks auftreten⁵⁹. Personen mit ACS können auch perakut an einem plötzlichen Herztod versterben. Trotz Verbesserungen bei Erkennung und Transportzeiten versterben immer noch etwa 25% der Patienten vor Erreichen des Krankenhauses². Patienten mit einem ACS werden anhand des EKGs in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit ST-Strecken-Hebung (STEMI) und solche ohne Hebung des ST-Segments (NSTEMI)⁶⁰.

Für Patienten mit stabiler Angina pectoris und Patienten, welche im lebensbedrohlichen Zustand eines ACS eingeliefert werden, unterscheidet sich das diagnostische und therapeutische Vorgehen.

2.4 Diagnose und Therapie

Bei Patienten mit Symptomen einer stabilen Angina pectoris werden neben der klinischen Untersuchung auch Untersuchungen mittels (Belastungs-)EKG und Echokardiographie eingesetzt. Neben der Diagnose steht hier vor allem die Evaluierung von Risikofaktoren im Vordergrund, anhand derer Patienten in Risikogruppen eingeordnet werden. Diese Einteilung dient auch der Auswahl der am besten geeigneten diagnostischen und therapeutischen Optionen⁶¹.

Therapeutisch steht bei stabiler Angina die medikamentöse Therapie im Vordergrund. Hier können eine Reihe verschiedener Medikamentengruppen zum Einsatz kommen, darunter β -Blocker, Nitrate, ACE-Hemmer, Statine und antikoagulative Präparate. Es wird eine Reduktion der Schmerzen und eine Senkung des Herzinfarktrisikos, und damit der Mortalität, angestrebt^{59,61}. Nitroglycerin wird bei Angina pectoris eingesetzt, um Schmerzzustände zu reduzieren oder zu verhindern⁶¹. β -Blocker reduzieren Herzfrequenz und –kontraktilität, was den myokardialen Sauerstoffverbrauch und darüber die Ischämie reduziert. Außerdem wird durch die Verlängerung der Diastole der Bluteinstrom in die Koronarien gesteigert, die Perfusion des Myokards verbessert und so zusätzlich das Auftreten von ischämischen Zuständen und Angina pectoris reduziert. Wichtig zur Prävention von kardiovaskulären Ereignissen ist

außerdem eine anti-thrombozytäre Therapie. Hier wird besonders niedrig dosiertes Aspirin als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt⁵⁹. Des Weiteren wird der Therapie von Hyperlipidämien große Bedeutung beigemessen (siehe 2.4.2 Statintherapie).

Lässt sich den Patienten medikamentös nicht ausreichend helfen, so können auch Patienten mit stabiler Angina invasiv im Rahmen einer Perkutanen Koronarintervention (PCI) behandelt werden.

Bei Patienten, die mit einem ACS eingeliefert werden, hat die Revaskularisation des betroffenen Koronarsegments Priorität. Bei Patienten mit STEMI sollte, wenn möglich, immer, bei NSTEMIs risikoabhängig, eine Angiografie des Koronarbaums durchgeführt werden. Diese ermöglicht die Darstellung der Läsion (oder Läsionen) und eine sofortige PCI bei Bedarf^{60,62}. Vor allem bei Patienten mit komplizierten Verschlüssen ist unter Umständen auch eine Bypass-Operation möglich⁶⁰. So bestätigte die SYNTAX-Studie die Überlegenheit der Bypass-OP über die PCI bei schweren Dreifäßerkrankungen und Verschlüssen der linken Hauptkranzarterie (LAD)⁶³. Auch bei ACS kann medikamentös mittels Fibrinolyse eine Reperfusion erreicht werden. Sie wird vor allem dann eingesetzt, wenn eine PCI nicht oder nicht schnell genug (den ESC-Guidelines von Steg, et al. zufolge innerhalb von < 120 min nach dem ersten Patientenkontakt) durchgeführt werden kann. Entscheidend für den Erfolg der Fibrinolyse ist ein Therapiebeginn < 12 h nach Einsetzen der Symptome⁶².

Nach erfolgreicher Revaskularisation werden auch ACS-Patienten medikamentös behandelt. Hier hat insbesondere die antikoagulative Therapie mittels Aspirin oder dualer Antiplättchentherapie (Kombination von Aspirin und einem P2Y₁₂-Inhibitor, wie Clopidogrel) sowie die Senkung erhöhter Cholesterinspiegel durch den Einsatz von Statinpräparaten große Bedeutung⁶².

Sowohl präventiv als auch nach einem Infarktereignis spielt zusätzlich eine Reduktion der Risikofaktoren durch Änderung der Lebensgewohnheiten eine enorme Rolle. So können Raucher allein dadurch, dass sie nach einem Herzinfarkt mit dem Rauchen aufhören, ihre Mortalität um bis zu 36% senken^{61,62,64}. Gesunde Ernährung, körperliche Betätigung und bei Bedarf Gewichtsverlust wirken sich ebenfalls positiv auf das Auftreten von Koronarereignissen aus⁶¹.

Diagnose, Risikostratifizierung und Therapie von KHK/ACS sind ein äußerst komplexes Thema, auf das im Rahmen dieser Arbeit nicht ausführlicher eingegangen werden kann. Aufgrund der Relevanz für den durchgeführten Versuch soll lediglich auf PCI, einschließlich der OCT-Untersuchung und Statintherapie noch näher eingegangen werden.

2.4.1 Perkutane Koronarintervention (PCI)

Unter der PCI (*percutaneous coronary intervention*) versteht man ein invasives Verfahren zur Behandlung stenosierter Koronargefäße.

Der Zugang zum Gefäßsystem erfolgt über das Einbringen einer Gefäßschleuse in die Arteria femoralis oder in die Arteria radialis, wobei neue Untersuchungen eine geringere Komplikationsrate und reduzierte Mortalität bei Radialiszugang zeigen konnten^{60,65}. Im Gegensatz zu dem im vorgestellten Tiermodell (siehe 2.5 Operation 1) durchgeführten Zugang mit Präparation des Gefäßes wird in der Humanmedizin der Gefäßzugang über eine perkutan eingebrachte Schleuse erreicht. Nach erfolgreicher Positionierung der Schleuse im Gefäß mittels Seldingertechnik ermöglicht deren Aufbau den Zugang zum Gefäßsystem und das Einbringen von „Werkzeugen“ für die Koronarintervention ohne weitere Manipulation des Gefäßes und ohne Blutverlust⁶⁶.

Zunächst wird ein Führungsdraht in den Aortenbogen bis in den Sinus aortae vorgeschoben und dort in den Koronarostien positioniert. Unter Durchleuchtung kann der Operateur jederzeit die Bewegungen des Drahtes kontrollieren und den Erfolg der Katheterisierung feststellen. Nach erfolgreicher Positionierung des Katheters kann der Blutfluss im Koronargefäß gemessen, vorsichtig Kontrastmittel injiziert und nach und nach der gesamte koronare Gefäßbaum dargestellt werden. Stenosen oder vollständige Okklusionen können ausgewertet werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass mittels Kontrastmittelröntgen lediglich ein zweidimensionales Bild erstellt werden kann⁶⁶. Außerdem liefert die Angiografie keine Aussagen über den Charakter detektierter Läsionen. Deshalb wurden zusätzliche bildgebende Verfahren entwickelt, darunter die OCT (siehe 2.4.1.2)⁶⁵.

Im Anschluss an die Koronarangiografie und eventuell weitere Bildgebung, besteht die Möglichkeit, bei Bedarf unmittelbar interventionell tätig zu werden. Unter Berücksichtigung verschiedenster Parameter, darunter Lokalisation, Länge und Komplexität der Läsion, der

Stenose und des Gefäßdurchmessers wählt der Operateur ein geeignetes Vorgehen und dazu passendes Equipment aus. Dieses wird durch den Katheter bis zur Läsion vorgebracht und positioniert. Stents können direkt implantiert werden oder die Stenose kann zuvor mittels Ballonkatheter aufgeweitet werden. Auch eine Ballon-gestützte Nachdilatation eines zuvor implantierten Stents ist möglich. Heutzutage wird nur noch selten eine reine Ballondilatation ohne anschließende Stentimplantation durchgeführt⁶⁶.

Im Rahmen von Diagnostik und Therapie wurden 2016 in Deutschland 377.763 PCIs durchgeführt, in über 90% davon wurden Stents implantiert⁶⁷. Insgesamt 339.931 Stück in 2015. Mehr als 90% der eingesetzten Stents waren dabei DES, 2,1% der Stents BRS⁶⁷. Im Folgenden soll näher auf die zur Verfügung stehenden Stentsysteme und die Fortschritte bei der Stententwicklung eingegangen werden.

2.4.1.1 Stents

In der Anfangsphase der interventionellen Kardiologie wurde zunächst noch nicht mit Stents gearbeitet. Stenosen wurden lediglich mittels Ballon aufgeweitet, der Plaque an die Gefäßwand angedrückt. Dieses Verfahren wurde im Jahre 1977 als erstes von Andreas Grüntzig angewandt und als Ballonangioplastie oder perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) bezeichnet. Die Problematik der PTCA bestand im oft akuten Verschluss des behandelten Gefäßes aufgrund von Dissektionen der Gefäßwand und der elastischen Rückstellkraft der Arterie. Proliferationsvorgänge der Neointima trugen ebenfalls zur Entstehung von Restenosen bei^{6,10}.

Stents, als (in diesem Zusammenhang) vaskuläre Endoprothesen, wurden entwickelt, um diese Problematik zu überwinden, das Gefäß im Dilatationszustand nach Ballonanwendung zu halten und den sog. elastischen „*recoil*“ (darunter versteht man die Rückkehr zum prä-Dilatations-Durchmesser innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach erfolgter PTCA aufgrund der Elastizität des Gefäßes) zu verhindern⁶. 1986 implantierten Sigwart und Kollegen den ersten Koronarstent. Es handelte sich um ein selbstexpandierendes Gerüst aus rostfreiem Edelstahl⁵.

2.4.1.1.1. Bare Metal Stents (BMS)

Heute bezeichnet man diesen Stenttyp als *bare metal stent* (BMS), worunter man ein Stentgerüst aus Metall versteht, das unbeschichtet ist und lebenslänglich in der therapierten Koronararterie verbleibt. Selbstexpandierende Stents wurden bald durch ballonexpandierbare Stents abgelöst. Hier ist der Stent auf einem Ballon vormontiert, welcher mit Kontrastmittelhaltiger Flüssigkeit gefüllt und so aufgepumpt wird. Dabei wird der Stent entfaltet und in die Gefäßwand gedrückt. Nach Deflation des Ballons kann dieser vorsichtig aus dem implantierten Stent entfernt werden⁶⁸.

In den 90er-Jahren konnten zwei große Studien zeigen, dass der Einsatz eines BMS einer alleinigen PTCA überlegen ist, weshalb der Stenteinsatz im Rahmen der PCI drastisch zunahm^{69,70}. In Untersuchungen mit mittlerem und langem Follow-up zeigte sich jedoch schnell das Problem des BMS: In 20-30% der Stents entwickelte sich eine erneute Stenose innerhalb des Stents, eine sog. In-Stent Restenose (ISR). Hervorgerufen wird diese im BMS vor allem durch Heilungsvorgänge der Gefäßwand, die mit drastischer Neointimahyperplasie (NIH) einhergehen und das neu geschaffene Lumen wieder zunehmend stenosieren⁶. Im Rahmen der Einheilung des Stents wird dieser durch eine neu gebildete Gewebeschicht, die Neointima, wieder vom Blutstrom getrennt, die Neointima re-endothelialisiert. Die NIH wird durch die Proliferation von VSMCs hervorgerufen, welche extrazelluläre Matrix produzieren und so dazu führen, dass die Neointima zunehmend dicker wird und das Lumen einengt bis hin zur ISR⁶⁸. Auf die Therapie der ISR wird unter 3.3 näher eingegangen.

2.4.1.1.2. Drug Eluting Stents (DES)

Medikamenten-freisetzende Stents, die sog. *drug eluting stents* (DES), sind eine Weiterentwicklung des BMS, mittels derer der Problematik der NIH entgegengewirkt werden sollte. 1999 wurde der erste DES implantiert und war drei Jahre später kommerziell erhältlich⁶. DES bestehen aus einem metallenen Grundgerüst, welches mit einem Polymer beschichtet ist. Das Polymer enthält das Medikament, das Stent-abhängig über einen bestimmten Zeitraum hinweg freigesetzt wird. Das Medikament wirkt anti-proliferativ und unterdrückt so die NIH¹⁰.

Eine Vielzahl an Medikamenten wurde im Rahmen der DES-(Weiter-)Entwicklung eingesetzt, darunter neben Paclitaxel die Wirkstoffe der -Limus-Gruppe, wie Everolimus und Sirolimus.

Sirolimus und Paclitaxel zählen zu den am meisten verbreiteten Wirkstoffen in DES⁶⁸. Auch die im vorgestellten Tierversuch verwendeten Stents setzen Sirolimus frei. Bei diesem Stoff handelt es sich um Rapamycin, ein immunsuppressiv wirkendes Medikament⁶. Durch inhibitorische Bindung des „*mammalian target of rapamycin*“ (mTOR) wird der Zellzyklus von glatten Muskelzellen in der späten G1-Phase blockiert, VSMCs in ihrer Proliferation und Migration gehemmt und so einer NIH entgegengesteuert^{71,72}.

Gleich welches Medikament eluiert wird, um das Medikament auf dem Metallgerüst des Stents aufbringen zu können, wird eine Beschichtung eingesetzt. In den Anfängen der DES-Entwicklung kamen zunächst permanente Polymere zum Einsatz, die das Stentgerüst zeitlebens umgeben. Präklinische Studien, intrakoronare Bildgebung und pathologische Untersuchungen zeigten bald, dass diese Polymere eine persistierende Entzündung hervorrufen können, die weitere nachteilige Entwicklungen auslöst^{72,73}. Deshalb wurden für DES der 2. und 3. Generation Substanzen mit höherer Biokompatibilität und später bioresorbierbare Polymere entwickelt, sodass „nur“ das Metallgerüst in der Gefäßwand zurückbleibt⁷².

Bereits in der BMS-Ära wurde der Einfluss des Designs des Metallgerüsts erkannt. Insbesondere Durchmesser und Geometrie der Stentstreben, aber auch die Flexibilität des Metallkäfigs haben Einfluss auf die Implantation und den dabei der Gefäßwand zugefügten Schaden. Dickere Streben führen zu höheren Restenoseraten⁷², weshalb auch bei den DES-Devices immer dünneren Streben entwickelt wurden. Dank des Einsatzes von Cobalt-Chrom- und Platin-Chrom-Verbindungen, welche eine höhere Festigkeit als Edelstahl (316L SS) aufweisen, konnte die Strebendicke drastisch reduziert werden. Sie bewegt sich heute zwischen 60 und 90µm⁷².

Mit der Einführung der DES konnte ein bahnbrechender Erfolg bei der Verhinderung von durch Neointimahyperplasie hervorgerufenen In-Stent-Restenosen erreicht werden⁷. Allerdings wurde bald deutlich, dass DES eine andere Problematik verursachten, die späten und sehr späten Stentthrombosen (ST)^{10,74}. Ursächlich ist, neben bereits angesprochenen Hypersensitivitäten hervorgerufen durch das Polymer, insbesondere das eluierte Medikament selbst⁶. Die anti-proliferative Wirkung führt zu einer verzögerten Einheilung des Stents, thrombogen wirkende Streben sind noch lange nach Implantation im Lumen detektierbar⁷⁵. Zudem ist die anti-proliferative Wirkung nicht-selektiv und betrifft nicht, wie gewünscht nur VSMCs, sondern auch die ECs⁷⁶. Dadurch dauert die Re-Endothelialisierung im Stent länger.

Darüber hinaus hat man festgestellt, dass die nachwachsenden ECs auch in ihrer Funktion gestört sind⁷⁷, wodurch vermutlich der Neoatherosklerosebildung Vorschub geleistet wird (näheres siehe 3 Neoatherosklerose).

2.4.1.1.3. Bioresorbierbare Stents (BRS)

In die seit einiger Zeit verfügbaren vollständig bioresorbierbaren Koronarstents wird die große Hoffnung gesetzt, dass mit ihrem Einsatz noch vorhandene Probleme der Metallstents überwunden beziehungsweise umgangen werden können. Zu den Mankos der permanenten Stents zählen (1) der lebenslänglich im Gefäß zurückbleibende Metallkäfig, welcher eine natürliche Vasomotorik mit bedarfsangepasster Vasodilatation ebenso verhindert, wie (2) ein mögliches „*positive remodeling*“ (darunter versteht man die vom Gefäß ausgehende Vergrößerung des Gefäßdurchmessers, um den Lumendurchmesser zu erweitern und damit eine Stenose, z. B. durch entstandene Neointima, auszugleichen). Außerdem kann ein permanenter Stent als (3) metallener Fremdkörper über Entzündungsreaktion und Thrombozytenaggregation eine In-Stent-Restenose triggern und (4) weitere Eingriffe zur Revaskularisation (bei einer ISR) über PCI oder Bypass erschweren oder unmöglich machen¹⁰.

Das Konzept eines BRS oder „Scaffolds“ (englisches Synonym für BRS, welches „Gerüst“ bedeutet und ausdrückt, dass das Device abgebaut wird, vergleichbar einem Baugerüst) besteht darin, dass zwar initial eine Stütze des therapierten Gefäßes nach Ballondilatation benötigt wird, um das Gefäß während der Heilung zu stärken und den *elastic recoil* aufzufangen, auf lange Sicht diese jedoch nicht nur nicht benötigt wird, sondern aus oben genannten Gründen sogar negative Auswirkungen haben kann. Dementsprechend erhofft man sich von komplett resorbierbaren Stents eine Reihe theoretischer Vorteile gegenüber permanenten Metallstents: (1) Wiedererlangung der normalen Vasomotorik, mit an den Bedarf angepassten Vasodilatation/-konstriktion, (2) verbesserte Eingriffsmöglichkeiten bei Revaskularisation, sowohl über erneute PCI als auch im Rahmen einer Bypass-OP, (3) keine permanent „überstenteten“ Gefäßabzweigungen mit der Gefahr von Minderperfusion und Flussverwirbelungen im Seitenast, (4) Möglichkeit des sog. *positive remodelings* und (5) vollständige Regeneration des Endothels mit reduzierter Gefahr von Neoatherosklerose und ST^{10,78}. Man spricht im Zusammenhang mit BRS auch von der sog. „*vascular restoration therapy*“^{79,80} und meint damit die vollständige Wiederherstellung der physiologischen

Gefäßfunktionen nach erfolgreicher Behandlung einer atherosklerotischen Läsion und Resorption des Scaffolds.

Vorgänge bei der Bioresorption: Zugelassene BRS werden entweder aus einem abbaubaren Polymer oder aus einer resorbierbaren Magnesium-Verbindung hergestellt. Polymer-BRSs bestehen aus Polylactiden, vor allem *poly-L-lactic-acid* (PLLA). Im Laufe des Resorptionsprozesses kommt es über Hydrolyse zur Freisetzung von Milchsäure, welche letztendlich über den Citratzyklus zu CO₂ und H₂O abgebaut werden kann⁷⁸. Diese Verbindungen werden auch als Beschichtung in DESs eingesetzt und können auch im BRS mit anti-proliferativen Medikamenten versetzt werden. So setzte etwa der PLLA-BRS Absorb™ der Firma Abbott (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA), auf dem im Folgenden noch näher eingegangen werden soll, Everolimus frei.

Ein anderes BRS-Konzept stellen vollständig resorbierbare Metallstents dar, welche sich durch Korrosion auflösen. Das einzige bislang zugelassene Modell basiert auf Magnesium (Mg). Da sich reines Mg im Organismus viel zu schnell auflösen würde, müssen Mg-Legierungen eingesetzt werden⁷². Auch bei dem im vorgestellten Tierversuch untersuchten Stent handelt es sich um einen Mg-BRS, den Magmaris® (auch *DREAMS 2G*) der Biotronik AG (Bülach, Schweiz). Da Erfahrungen mit Vorgänger-Modellen des Magmaris® (AMS 1, AMS 2 und *DREAMS 1G*) gezeigt haben, dass der Resorptionsprozess der Mg-Legierung trotzdem noch zu schnell abläuft, wird das Mg-Grundgerüst mit einem *Coating* aus PLLA umgeben, um die Korrosion des Magnesiums weiter zu verlangsamen. Das *Coating* wird außerdem als Träger für Medikamente genutzt⁷². Der Magmaris® setzt Sirolimus frei. Der Abbau des PLLAs erfolgt wie oben beschrieben. Das Mg reagiert zunächst mit Wasser zu Magnesiumhydroxid, welches weiter abgebaut wird zu Magnesiumphosphat. Letztlich entsteht amorphes Calciumphosphat mit hohem Wassergehalt⁸¹. Innerhalb eines Jahres ist das Mg zu etwa 95% abgebaut, nach zwei Jahren zu über 99%^{82,83}.

Studienergebnisse des Absorb™: Nach Zulassung und Anwendung des Absorb™ (Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) in der EU und später auch in den USA konnten erste Studien zunächst dessen Sicherheit und erste vielversprechende Ergebnisse zeigen⁸⁴. Weitere Studien präsentierten ähnliche Ergebnisse des BRS im Vergleich zu den besten am Markt erhältlichen DES^{85–87}. Anschließend veröffentlichte Daten zeigten jedoch ein schlechteres Abschneiden des

PLLA-Scaffolds auf. So konnten Serruys und Kollegen im 3-Jahres-Follow-up der ABSORB-II-Studie überraschenderweise keine Überlegenheit des Scaffolds in Bezug auf Vasomotorik feststellen⁸⁸. Darüber hinaus war die Zahl an Scaffold-Thrombosen (ScT) unerwartet hoch⁸². Cassese et al. präsentierten in ihrer Meta-Analyse höhere Raten an ScT im Absorb™⁸⁹ und Ali et al. untermauern diese Ergebnisse⁹⁰. Während neueste DES nach 12 Monaten eine Thrombooserate von bis zu 0,9% aufweisen, zeigten Puricel et al. in ihrer Studie ScT-Raten bis zu 3%⁹¹. Teilweise wird dieses schlechte Ergebnis auf das ungewohnte Implantationsverhalten des PLLA-Scaffolds zurückgeführt. Ein optimiertes Implantationsprotokoll hatte positive Auswirkungen auf die Ereignisraten des Absorb™. Die besorgniserregenden 3-Jahres-Ergebnisse führten jedoch letztlich dazu, dass das Device im September 2017 vom Markt genommen wurde. Während frühe ScT auf Fehler bei der Implantation hinweisen können, waren die Ursachen für die beobachteten sehr späten ScT zunächst unklar. Yamaji und Kollegen konnten dann jedoch in einer OCT-Studie von Patienten mit sehr späten ScT zeigen, dass in über 42% der Fälle Scaffold-Diskontinuität ursächlich war. Darunter versteht man den Verlust der zirkulären Stentstruktur durch die Bioresorption und im Rahmen dessen das Eindringen von diskontinuierlichen Stentstreben in das Lumen. Dort sind sie Nidus der Thrombozytenaggregation⁹². Obwohl die Studie einige Limitationen aufweist, macht das Ergebnis deutlich, dass Veränderungen an möglichen Nachfolgern des Absorb™ sich auf Device-Design und Verbesserungen bei der Resorption konzentrieren müssen^{92,93}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ersten positiven Ergebnisse des Absorb™ aus kleinen Studien mit hochselektiven Patienten und Läsionen stammten und sich in größeren, randomisierten Studien mit längerem Follow-up nicht bestätigen ließen. Hier wurden durch das vermehrte Auftreten von ScT Probleme mit dem Device offensichtlich.

Studienergebnisse des Magmaris®: Zurzeit ist die Datenlage zum Magmaris®, welcher als erster vollständig bioresorbierbarer Metallstent im Juni 2016 in Europa zugelassen wurde, noch klein mit wenigen Patienten und kurzen Follow-up-Zeiten⁸¹. Insgesamt zeigte der Magmaris® ein besseres Implantationsverhalten als BRS aus Polymeren, mit höherer Zugfestigkeit bei gleichzeitig größerer Flexibilität und leichterem Handling im Gefäßsystem, dank der Lasergeglätteten Oberfläche⁸². Auch die Implantation entspricht eher der eines herkömmlichen DES⁹⁴. 6 Monate nach Implantation zeigte die BIOSOLVE-II-Studie (erste Studie des Magmaris® in Humanpatienten) zunächst vor allem, dass die am Vorläufermodell vorgenommenen

Veränderungen zu klinischen Verbesserungen bei *Late Lumen Loss* (LLL, spät auftretender Lumenverlust im Stent) und NIH geführt hatten. Es wurden keine ScT beobachtet⁹⁴. Ergebnisse aus BIOSOLVE-II 12 Monate nach Scaffold-Implantation zeigten eine weitgehend stabile Situation und weiterhin keine ScT. Der beobachtete LLL war im Vergleich zu neuen DES zwar ausgeprägter, dies wirkte sich jedoch nicht negativ auf klinische Parameter wie *target lesion revascularisation* (TLR, Zielgefäßrevaskularisation, PCI um In-Stent-Restenose zu behandeln) und Thrombose aus. Vasomotion konnte bereits nach 6 Monaten beobachtet werden und hatte bei der 12-Monats-Untersuchung weiter zugenommen. *Late Lumen Enlargement* (späte Zunahme des Lumens im Stent), wie man es in Magmaris®-Vorgängern und Polymer-BRS beobachtet hatte, konnte nicht gezeigt werden. Die Untersucher gehen jedoch davon aus, dass dieser Effekt aufgrund der Veränderungen am BRS wahrscheinlich erst später auftreten wird⁹⁵. In einer gepoolten Analyse der 24-Monats-Ergebnisse der BIOSOLVE-II- und BIOSOLVE-III-Studien von Haude und Kollegen werden die Resultate des Magmaris® weiterhin als günstig und das Device insgesamt als sicher eingestuft (weiterhin unter Vorbehalt aufgrund geringer Patientenzahl, einfacher Läsionen, kein direkter Vergleich zu einem anderen Scaffold oder DES)⁹⁶. Nach 24 Monaten liegt die Rate an *target lesion failure* (TLF, Zielgefäßverschluss) bei 5,9% und ist damit besser als die von Polymer-BRS nach dem gleichen Zeitraum (TLF von Absorb™ in ABSORB-II-Studie bei 7,0%). ScT wurden auch nach 24 Monaten keine beobachtet, was die Untersucher als positives Signal werten⁹⁶. Daten aus Studien mit größerem Patientenumfang, komplexeren Läsionen und aus Vergleichsstudien zu handelsüblichen DES stehen noch aus.

Neben diesen beiden, etwas detaillierter vorgestellten BRS gibt es mittlerweile andere zugelassene Modelle (DESOLVE (Elixir Medical, CA, USA), FANTOM (Reva Medical, CA, USA)) und eine ganze Reihe weiterer, die in früheren Entwicklungsphasen sind⁹⁷.

2.4.1.2 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Nicht nur bei den verfügbaren Stentsystemen haben neue Entwicklungen zu Verbesserungen geführt. Auch bei den im Rahmen einer PCI einsetzbaren bildgebenden Verfahren wird die Angiografie heute durch Neuerungen ergänzt. Darunter befindet sich die OCT (*optical coherence tomography*). Bei der OCT handelt es sich um ein unter anderem in der interventionellen Kardiologie eingesetztes bildgebendes Verfahren, mit dessen Hilfe hochauflösende Querschnitte des untersuchten Gefäßes erstellt werden können. Das Funktionsprinzip ähnelt dem des Ultraschallgeräts, jedoch wird statt Schall Licht in das Gewebe ausgesandt und von unterschiedlichen Materialien verschieden absorbiert und reflektiert. Zurückgeworfene Lichtstrahlen, mit den in ihnen enthaltenen Informationen, werden ausgelesen und zu einem zweidimensionalen Bild zusammengefügt⁹⁸. Die OCT besticht durch eine hohe Auflösung, wird jedoch durch die geringe Eindringtiefe von nur 1 bis 2 mm limitiert⁹⁹.

Soll eine OCT-Untersuchung im Rahmen einer PCI durchgeführt werden, wird der OCT-Katheter über den Führungsdraht am distalen Ende der Läsion positioniert. Die OCT-Aufnahme wird als sog. „*pullback*“ durchgeführt. Dies bedeutet, dass die OCT-Sonde in einer transparenten Hülle von distal nach proximal vollautomatisch durch das Gefäß gezogen wird und dabei Schnittbilder erstellt. Da auch Blut und insbesondere Blutzellen die ausgesandten Lichtstrahlen absorbieren, streuen und reflektieren, ist für die OCT-Anwendung im Gefäßsystem die Blutleere im zu untersuchenden Abschnitt entscheidend. Neue Systeme arbeiten dafür nicht mehr mit okkludierenden Ballons proximal des zu untersuchenden Abschnitts, sondern mit sehr schnellen *pullbacks*, während zeitgleich das Blut mit einem Kontrastmittel ausgespült wird¹⁰⁰.

Im Rahmen einer PCI kann die OCT aus verschiedenen Gründen zum Einsatz kommen und kann sowohl vor der Stentimplantation als auch danach wichtige Erkenntnisse liefern. Vor der Implantation liefert die OCT-Untersuchung eine qualitative Beurteilung des Plaques, sowie detaillierte Aussagen zur Stenose (Grad, Genese, Länge und Lokalisation), dem Referenzdiameter und damit der einzusetzenden Stentgröße. Wird die OCT post-implantationem durchgeführt, kann die korrekte Positionierung des Stents, mit Beurteilung von Entfaltung und Malapposition (Streben liegen der Gefäßwand nicht richtig an, Quelle für Thrombose) beurteilt werden. Auch Aussagen über eine Verletzung des Gefäßes im Rahmen der Implantation sind möglich^{99,101}.

2.4.2 Statintherapie

Wie oben bereits ausgeführt, wird neben den invasiven Therapiemöglichkeiten, die bereits etwas genauer beleuchtet wurden, auch medikamentösen Ansätzen eine wichtige Bedeutung bei der Behandlung der KHK beigemessen. Eine Säule dabei ist die Einnahme von Statinpräparaten. Bei Statinen handelt es sich um HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) ist ein Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese in der Leber. Sie katalysiert die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonsäure. Statine wirken durch reversible, kompetitive Hemmung auf dieses Enzym, wobei sie eine höhere Affinität zur HMG-CoA-Reduktase aufweisen als HMG-CoA selbst¹⁰². Infolge wird die Synthese von Cholesterin gehemmt. Intrazellulär resultiert ein Mangel an Cholesterin, welcher die Leberzellen dazu anregt, vermehrt LDL-Rezeptoren zu exprimieren. Es wird mehr LDL-Cholesterin aus dem Blut aufgenommen, der Serumcholesterinspiegel sinkt ab³¹.

Eine Vielzahl an Studien konnte die positiven Auswirkungen der Statintherapie belegen. So konnte eine große Meta-Analyse an über 90 000 Patienten zeigen, dass die Reduktion des Cholesterinspiegels mit einer Reduktion von Koronarereignissen und Mortalität einhergeht¹⁰³. Statine können das Voranschreiten atherosklerotischer Läsionen verlangsamen oder sogar umkehren³¹. Heute weiß man, dass die positive Wirkung der Statine nicht allein von der Senkung des Serumcholesterinspiegels herrührt. Zusätzliche Auswirkungen werden unter dem Begriff „pleiotrope Effekte“ zusammengefasst. Das Produkt der HMG-CoA-Reduktase Mevalonat wird im Organismus nicht nur für die Cholesterin-, sondern darüber hinaus auch für weitere Biosynthesen benötigt¹⁰⁴. Dadurch können pleiotrope Effekte zumindest teilweise erklärt werden. Pleiotrope Effekte sind ein komplexes Feld, in dem in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht werden konnten. Eine detaillierte Darstellung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb hier nur einige bekannte Interaktionen kurz aufgeführt werden sollen: (1) Reduktion der Plättchenaggregation; (2) Senkung der atherogenen Wirkung von oxLDL; (3) Förderung der Bildung von NO und (4) Hemmung der Proliferation von VSMCs¹⁰⁴. Auch eine Stabilisierung des Plaques wird ihnen zugesprochen, da sie die Expression von Matrix-Metallo-Proteinase durch Makrophagen hemmen, welche durch ihre proteolytischen Eigenschaften auf eine Ruptur des *fibrous cap* hinwirken^{104,105}.

Die Statintherapie ist mit relativ wenigen Nebenwirkungen verbunden. Dazu zählen Rhabdomyolyse und Anstieg der Leberenzyme, der jedoch normalerweise durch Dosisreduktion aufgefangen werden kann. Die Entwicklung eines Leberversagens ist extrem selten³¹ und es konnte kein Anstieg von nicht-kardialen Todesursachen unter Statintherapie beobachtet werden¹⁰³.

Zur Fragestellung, ob Statine sich auch positiv auf Neoatherosklerose auswirken, gibt es bislang keine Untersuchungen.

3 Neoatheroklerose

Unter Neoatherosklerose versteht man die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen in der Neointima, dem innerhalb eines implantierten Stents neu gebildeten Gewebe¹⁰⁶. Dabei präsentieren sich die auftretenden Umwandlungen des Gewebes wie naive Atherosklerose mit einer zunehmenden Verdickung der Neointima, Ansammlung von Schaumzellen, der Entstehung von *lipid pool* und *necrotic core*. Auch neoatherosklerotische Läsionen können als TCFA instabil werden und durch Einrisse der Kappe eine In-Stent-Thrombose auslösen⁸. Es finden sich Cholesterinkristalle und Neovaskularisation.

Die unter dem Stent zu liegen kommende atherosklerotische Läsion ist dabei nicht Quelle der lipidreichen Veränderungen. So stehen die neoatherosklerotischen Lipidansammlungen in der Neointima nicht mit dem ursprünglichen atherosklerotischen Plaque in Verbindung^{75,77}. Otsuka und Kollegen konnten zwar in 20% der von ihnen untersuchten Fälle nachweisen, dass die neoatherosklerotischen Läsionen mit Plaques proximal und distal des Stentbereichs in Verbindung stehen, zeigten jedoch beim Großteil der neoatherosklerotischen Plaques, dass diese ihren Ursprung im gestenteten Bereich haben⁷⁷.

Literaturangaben zur Prävalenz von Neoatherosklerose schwanken stark, vor allem abhängig von Stenttyp, Implantationszeit und Auswahl der Patienten. **Tabelle 1** gibt einen Überblick. In allen aufgeführten Studien wurden die Ergebnisse mittels OCT-Untersuchungen erhoben.

Publikation	Patientenpool	Stent	Implantationszeit	Prävalenz
Takano ¹⁰⁷	routinemäßiges OCT-Follow-up	BMS (n=21)	≥ 5 Jahre	67%
Kang ¹⁰⁸	symptomatisch, In-Stent-Restenose	DES (n=50)	32 Monate (Mittelwert)	90%
Kang ¹⁰⁹	symptomatisch, In-Stent-Restenose	BMS (n=51)	≥ 10 Jahren	95%
Yonetsu ¹¹⁰	routinemäßiges OCT-Follow-up, Neointima ≥ 100 µm	DES (n=108), BMS (n=71)	27 Monate (Mittelwert)	47%

Kim ¹⁰⁶	routinemäßiges OCT-Follow-up, Neointima $\geq 100 \mu\text{m}$	DES (n=482)	≤ 12 Monate	6%
Lee ¹¹¹	> 50% Stenose	DES (n=212), davon 1. Gen. DES (n=101), 2. Gen. DES (n=111)	55 Monate (1. Gen. DES), 12 Monate (2. Gen. DES)	27%
Kuroda ¹¹²	routinemäßiges OCT-Follow-up	DES (n=277), BMS (n=37)	≥ 1 Jahr	17%

Tabelle 1: Prävalenz von Neoatherosklerose

In allen Publikationen wurden die Ergebnisse mittels OCT-Untersuchungen gewonnen. Eine Einschätzung der tatsächlichen Prävalenz wird insbesondere durch die verschiedenen zum Einsatz kommenden Stenttypen, Unterschiede bei der Implantationszeit und der Auswahl der Patienten erschwert.

Viele Studien zeigen jedoch konsistent, dass Patienten mit Neoatherosklerose einen schlechteren klinischen Verlauf haben als Patienten ohne Neoatherosklerose^{106,111,112}. Bei den tabellarisch dargestellten Studien ist der Einfluss des implantierten Stents zu beachten, ein Punkt, auf den im Folgenden noch näher eingegangen wird.

3.1 Abgrenzung

Zwischen Neoatherosklerose und Atherosklerose gibt es Gemeinsamkeiten. Der entscheidende Unterschied liegt in der zeitlichen Entwicklung der Veränderungen. So entsteht Atherosklerose im Laufe von Jahrzehnten, Neoatherosklerose entwickelt sich hingegen innerhalb von wenigen Monaten bis Jahren nach Stentimplantation^{77,113}.

Eine Reihe von Studien konnte mittlerweile zeigen, dass DES besonders betroffen sind. In ihnen entstehen neoatherosklerotische Läsionen deutlich früher und häufiger als in BMS^{8,75,108,114}. Nakazawa und Kollegen fanden in BMS neoatherosklerotische Veränderungen frühestens in Stents mit einer Implantationszeit von über zwei Jahren, während sie in DES bereits nach 70 Tagen zu finden waren. Und auch fortgeschrittene Stadien fanden sich früher in DES⁷⁵. Insgesamt war die Inzidenz für Neoatherosklerose höher in DES-behandelter Neointima (64,3% vs. 31,2% in BMS), obwohl die Implantationszeiten der DES deutlich kürzer waren als die der

BMS (Implantationszeiten von weniger als 2 Jahren: DES 85% vs. BMS 45%, Implantationszeiten von über 6 Jahren: DES 0% vs. BMS 17%)⁷⁵.

So führen die Autoren den Einsatz von DES (sie untersuchten DES der 1. Generation) und lange Implantationszeiten als Risikofaktor für die Entstehung von Neoatherosklerose auf. Außerdem scheint auch die überstentete atherosklerotische Läsion Einfluss auf die Neoatheroskleroseentstehung zu haben: Nakazawa et al. stellten einen zugrunde liegenden instabilen Plaque als Risikofaktor für Neoatherosklerose fest⁷⁵. Bei den weiteren Risikofaktoren für Neoatherosklerose bestehen ebenfalls Unterschiede zum atherosklerotischen Geschehen. So konnten Yonetsu und Kollegen in ihrer Untersuchung keine Korrelation zwischen den klassischen Risikofaktoren Bluthochdruck, Diabetes mellitus sowie Hyperlipidämie und Neoatherosklerose feststellen. Die Faktoren Rauchen und chronische Niereninsuffizienz waren jedoch mit erhöhtem Risiko für die Entstehung von neoatherosklerotischen Läsionen verknüpft¹¹⁰. Untersuchungen von Cui et al. lieferten ähnliche Ergebnisse¹¹⁵. Evaluationen von Kim et al. ergaben dagegen Bluthochdruck und erhöhte Cholesterinspiegel bei Stentimplantation als Risikofaktoren für die Entwicklung von Neoatherosklerose¹⁰⁶.

3.2 Pathogenese

Neoatherosklerose kann sich in allen permanenten Stents, sowohl in BMS als auch in allen Generationen von DES, entwickeln. Man geht davon aus, dass der Metallkäfig, den die Stentstreben darstellen, dem gestenteten Gefäß nicht mehr erlaubt sich an der natürlichen Vasomotion des Gefäßsystems zu beteiligen. Die Strömung im Stentbereich ändert sich, der laminare Fluss kann abreißen, es entstehen Bereiche mit besonders hohem oder niedrigem Scherstress¹¹⁶. Durch Flussverwirbelungen treten Veränderungen am Endothel auf und Blutbestandteile werden an bestimmten Punkten besonders in das Gewebe „gedrückt“. In einer BMS-behandelten Koronararterie mit häufig beobachteter NIH werden diese Vorgänge noch gefördert. Durch die übermäßige Proliferation von VSMCs in der Neointima nimmt das Lumen ab, Scherstress und Flussverwirbelungen nehmen weiter zu. Dies bedeutet, dass im BMS die Gründe für die Neoatheroskleroseentstehung den Ursachen für Atherosklerose (Entwicklung in Lokalisationen mit hohem Scherstress, wie Bifurkationen, Abzweigungen, Kurvaturen) ähneln^{9,75}.

In DES hingegen geht man davon aus, dass der Schlüssel zu der beobachteten früheren und häufigeren Neoatheroskleroseentstehung in einer gestörten Funktion des Endothels liegt⁹. Zunächst hemmen die vom Stent abgegebenen Medikamente die Proliferation der ECs, die Re-Endothelialisierung des Stentsegments ist verzögert. Zusätzlich wird durch das Medikament jedoch auch die Reifung der neuen ECs gestört. Die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen, die sog. *tight junctions*, sind abnormal ausgebildet und dadurch in ihrer Barrierefunktion gestört⁷⁷. Im Blut zirkulierende Substanzen, insbesondere Cholesterin und Entzündungszellen, dringen bei gestörter endothelialer Barriere vermehrt in die Neointima ein und lösen damit die Entstehung von Neoatherosklerose aus⁷⁷.

Im Rahmen der Weiterentwicklung von DES wurden bei der 2. Generation DES andere Medikamente eingesetzt, nur noch abluminal aufgebracht und die Polymere verändert. Man hoffte das Auftreten von ST und Neoatherosklerose zu verhindern. Dies gelang teilweise. Die 2. Generation DES schneidet bei den ST besser ab als die 1. Generation DES. Dies ist auf eine schnellere Re-Endothelialisierung zurückzuführen, wodurch thrombogene Stentstreben schneller abgedeckt werden¹¹¹. Positive Auswirkungen auf Neoatherosklerose sind jedoch nicht eindeutig, mit vergleichbaren Zahlen für DES der 1. und 2. Generation^{77,111}. Dies zeigt, dass trotz der schnelleren morphologischen Regeneration der Endothelzellen beim Einsatz von 2. Generation DES, das eluierte Medikament immer noch die Maturation der Zellen und Ausbildung reifer *tight junctions* verhindert⁷⁷.

Nachdem aber auch unabhängig vom Medikament das Prinzip des permanenten Metallstents schon mit der Entstehung von Neoatherosklerose in Verbindung gebracht wird (siehe oben), erhofft man sich von bioresorbierbaren Stents unter anderem auch Vorteile in Bezug auf das Auftreten von Neoatherosklerose¹⁰. Nach der Resorption des BRS soll das Gefäß die physiologische Vasomotorik wiedererlangen, wodurch sich der Stress auf die Gefäßwand (zyklischer Stress im Rahmen von Systole und Diastole und Scherstress) normalisiert¹¹⁷.

Bislang ist die Studienlage zur Evaluierung von Neoatherosklerose in BRS sehr dünn, da es sich um eine relativ neue Technik handelt, die Implantationszahlen noch recht niedrig und die Follow-up-Zeiten kurz sind. Humanmedizinische Studien zur gezielten Erhebung der Neoatherosklerose in bioresorbierbaren Stents konnten nicht gefunden werden. Studien, die sich mit der Untersuchung von späten und sehr späten ScT beschäftigen, sind bislang vor allem

durch kleine Fallzahlen limitiert. Yamaji et al. bringen in ihren Untersuchungen aus Absorb™-BRS sehr späte ScT zu einem hohen Anteil mit Scaffold-Brüchen im Rahmen der Resorption in Verbindung. Davon betroffen sind Streden, die nicht vollständig durch Neointima abgedeckt werden, bei Bruch des Devices ins Lumen ragen und dort zur Thrombusbildung führen. In 18,4% der mittels OCT untersuchten Thrombosen machten sie jedoch Neoatherosklerose als Ursache verantwortlich⁹².

Im 5-Jahres-Follow-up der ABSORB A-Studie zeigen Karanasos und Kollegen ein günstiges Einheilungsmuster des BRS mit Lumenerweiterung. Stentstreden sind in der OCT-Bildgebung nicht mehr nachweisbar. Die Neointima zeichnet sich durch ein breites, signalintensives Band aus homogenem Gewebe aus, welches darunterliegende Plaquebestandteile effektiv vom Blutstrom separiert. Vasomotion findet sich nicht in allen Patienten¹¹⁸. Dennoch kann von einer vorteilhaften Einheilung gesprochen werden. In einem Patienten zeigt die Neointima im BRS jedoch Anzeichen von Neoatherosklerose bis hin zur Plaqueruptur. In den gleichen Patienten zusätzlich implantierte DES zeigen alle neoatherosklerotische Veränderungen¹¹⁸. Obwohl insgesamt die Einheilung in dieser Studie als günstig bewertet werden kann, zeigt auch ein BRS Neoatherosklerose. In einzelne Fallberichten von verschiedenen anderen Autoren werden ebenfalls Absorb™-BRS mit neoatherosklerotischen Veränderungen vorgestellt^{119,120}.

3.3 Therapie

Neoatherosklerotische Plaques, ebenso wie z. B. Neointimahyperplasie (siehe 2.4.1.1.1 BMS), können zu In-Stent-Restenose führen. Klinische ISR (Patient präsentiert sich mit Angina oder Anzeichen eines Myokardinfarkts) bedürfen einer erneuten therapeutischen Intervention. Jedoch sind die therapeutischen Möglichkeiten begrenzt, evidenzbasierte Leitlinienempfehlungen fehlen und machen deutlich, dass Unklarheit bezüglich des geeigneten Vorgehens besteht. Aktuell wird zur erneuten Revaskularisation der Einsatz eines DES, insbesondere eines DES der 2. Generation, empfohlen^{121,122}.

Vor allem bei Patienten, die bereits mehrere Stents erhalten und eine wiederkehrende Symptomatik haben, ist jedoch auch der Einsatz Medikamenten-beschichteter Ballons angezeigt^{122,123}. Eine Bypass-Operation stellt bei Patienten mit wiederkehrender Symptomatik und komplexem Krankheitsbild ebenfalls eine Therapieoption dar¹²¹.

4 Atherosklerotische und neoatherosklerotische Tiermodelle

Während Neoatherosklerose noch ein relativ junges Forschungsfeld ist, wird die Atheroskleroseforschung seit Jahrzehnten intensiv in verschiedensten Tiermodellen betrieben¹²⁴. Das erste bekannte tierexperimentelle Modell wurde bereits im Jahre 1907 von Ignatowski gestartet. Er fütterte Kaninchen mit verschiedenen Lebensmitteln, darunter Ei und Fleisch und stellte atherosklerotische Läsionen in der Aorta fest¹²⁵. Auch andere Forscher begannen bald mit verschiedenen Fütterungsversuchen und machten zunächst tierische Proteine für die beobachteten Gefäßveränderungen verantwortlich. Untersuchungen, in denen den Tieren eine Diät gefüttert wurde, die lediglich im Cholesteringehalt erhöht war, konnten dann jedoch Cholesterin als Verursacher der Gefäßveränderungen definieren¹²⁶. Auch heute noch werden mit Cholesterin und pflanzlichen Ölen angereicherte Futtermittel zur Auslösung von Atherosklerose im Tiermodell verwendet.

Eine Reihe verschiedener Versuchstierspezies wurden in der Atheroskleroseforschung eingesetzt, darunter auch Hamster, Vögel und nicht-menschliche Primaten^{127,128}. Durchgesetzt haben sich jedoch vor allem Modelle in Mäusen, Schweinen und Kaninchen. Ein optimales Tiermodell sollte folgende Punkte erfüllen: (1) Tiere einfach zu halten und zu handeln, (2) Tiere unproblematisch in der Zucht und mit bekanntem genetischen Profil, (3) geeignete Größe für die geplante Forschung, (4) spontane Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen und (4) größtmögliche Übereinstimmung mit Fettstoffwechsel, Atheroskleroseentstehung, Läsionsaufbau und -lokalisation des Menschen^{124,129}. Leider gibt es jedoch kein Tiermodell, welches alle genannten Punkte abdeckt¹²⁹. **Tabelle 2** gibt eine Übersicht über die Vor- und Nachteile einiger Tierarten in der Atheroskleroseforschung, bevor in den folgenden Kapiteln noch etwas ausführlicher auf Maus, Schwein und insbesondere das Kaninchen eingegangen wird.

Tierart	Vorteile	Nachteile
Maus	<p>Zucht, Haltung und Handling relativ einfach</p> <p>Genetischer Hintergrund bekannt und leicht manipulierbar</p> <p>Schnelle Entwicklung atherosklerotischer Läsionen</p>	<p>Geringe Größe</p> <p>Keine spontanen Läsionen in Wildtyp-Mäusen, dafür aber genetisch-veränderte Linien</p> <p>Muriner und humaner Lipidmetabolismus unterschiedlich (HDL)</p> <p>Lokalisation der Läsionen</p> <p>Kaum komplizierte Läsionen</p>
Kaninchen	<p>Größe der Tiere (invasive Verfahren möglich, leicht zu handeln)</p> <p>Sehr Cholesterin-sensitiv</p> <p>Lipidmetabolismus dem des Menschen relativ ähnlich</p> <p>Linien mit familiärer Hyperlipidämie</p>	<p>Lokalisation der Läsionen</p> <p>Kaum Langzeitstudien möglich</p> <p>Kaum fortgeschrittene Läsionen</p> <p>Kaum Hepatische Lipase Aktivität</p>
Schwein	<p>Größe der Tiere (invasive Verfahren möglich)</p> <p>Lokalisation ähnlich wie Mensch, auch koronare Läsionen</p> <p>Porziner und humaner Lipidmetabolismus ähnlich</p> <p>Fortgeschrittene Modelle möglich (DM, Ballonverletzung für komplizierte Läsionen)</p> <p>Linien mit familiärer Hyperlipidämie</p>	<p>Größe der Tiere (schwer zu handeln) (außer Minipigs)</p> <p>Langwierige Versuche</p> <p>Thrombose durch Plaqueruptur selten</p>
Nicht-menschliche Primaten	<p>Größe der Tiere (invasive Verfahren möglich)</p> <p>Lipidmetabolismus dem humanen sehr ähnlich</p> <p>Koronare Plaques</p> <p>Plaques ähneln humanen Läsionen</p>	<p>Größe der Tiere</p> <p>Langwierige Versuche</p> <p>Streng reguliert nach TierSchVersV</p>
Quellen für Tabelle: ^{124,130–132}		

Tabelle 2: Vor- und Nachteile der wichtigsten Versuchstiere in der (neo-)atherosklerotischen Forschung

4.1 Mäuse

Heute ist die Maus das Tier, das in der atherosklerotischen Forschung am häufigsten angewendet wird. Dies wurde erst durch den Einsatz genetisch veränderter Linien möglich, da Wildtyp-Mäuse auch mit cholesterinreichem Futter resistent gegen die Entwicklung von Läsionen sind¹²⁴. Am häufigsten wird die apoE^{-/-}-Mauslinie verwendet, bei der das Apolipoprotein E (ApoE) defekt ist. Dieses stellt einen wichtigen Liganden bei der Aufnahme von Chylomikronen und *very low density lipoprotein* (VLDL) dar, sodass die Serumcholesterinwerte von apoE^{-/-}-Mäusen erhöht sind und die Tiere Plaques entwickeln, selbst wenn sie nur mit herkömmlichem Futter versorgt werden^{124,132}. Bei Cholesterin-angereichertem Futter entwickeln sich die Läsionen noch schneller und auch komplexe Veränderungen mit *fibrous cap*, *necrotic core*, Cholesterinkristallen und Verkalkungen treten auf^{132,133}. Ein weiteres häufig verwendetes, genetisch verändertes Mausmodell ist die LDLR^{-/-}-Maus. Dieser fehlt der LDL-Rezeptor, welcher für die Aufnahme von LDL aus dem Blut verantwortlich ist. Da bei Mäusen jedoch im Gegensatz zum Menschen Blutcholesterin hauptsächlich an HDL gebunden transportiert wird, führt dieser Knockout alleine nicht zur spontanen Entstehung von Läsionen. LDLR^{-/-}-Mäuse auf Cholesterinfutter entwickeln jedoch Plaques analog zu denen bei apoE^{-/-}-Mäusen¹²⁴.

Atherosklerotische Veränderungen in Mäusen entstehen - wie auch beim Menschen - an Stellen des Gefäßsystems mit verändertem Blutfluss, insbesondere niedrigem Scherstress. Mäuse entwickeln Läsionen in Aortenwurzel und -bogen sowie an Aortenabzweigungen, wie der Arteria brachicephalica, A.carotis und A.subclavia^{124,132}. Obwohl sich die Veränderungen von der Aortenwurzel manchmal ein kleines Stück in die Koronarostien hinein erstrecken können, entwickeln weder apoE^{-/-}- noch LDLR^{-/-}-Mäuse Veränderungen im Koronarbaum, wie man sie beim Menschen beobachtet¹³¹. In Mauslinien mit zusätzlichen Veränderungen (z. B. apoE^{-/-} Fbn1^{C1039G+/-}, Tiere mit einer zusätzlichen Mutation im Fbn1-Gen) wurden jedoch auch bereits koronare Atherosklerose, einschließlich koronarer Okklusion und Infarkt beobachtet¹²⁴. Heute gibt es eine Vielzahl verschiedener Mausmodelle, die im Rahmen der Atheroskleroseforschung eingesetzt werden^{128,134}, auf die im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht näher eingegangen werden kann.

Vor- und Nachteile des Mausmodells sind in **Tabelle 2** aufgeführt. Ein Nachteil, der insbesondere bei der Erprobung neuer Techniken der Interventionellen Kardiologie, wie Therapie- oder Imaging-Devices ersichtlich wird, ist die geringe Größe der Maus¹³¹. Deshalb sind für solche Untersuchungen Tests in Großtieren, wie dem Kaninchen oder dem Schwein nötig.

4.2 Schweine

Das porcine Herz-Kreislauf-System ist dem des Menschen ähnlich. Auch die Reaktion der Gefäße, einschließlich der Koronarien auf atheromatöse Stimuli, deckt sich mit der humaner Arterien¹³⁵. In der Atheroskleroseforschung werden neben Hausschweinrassen auch Minipigs eingesetzt, da diese aufgrund geringerer Größe und Gewicht deutlich leichter zu handeln sind. Bei Schweinen dauert es jedoch selbst bei hohen Cholesteringehalten im Futter über zwei Jahre, bis erste Läsionen entstehen¹³⁵. Rapacz und Kollegen entwickelten deshalb eine Schweinelinie, die aufgrund einer Mutation des LDLR spontane Hypercholesterinämie und atherosklerotische Läsionen ausbildet. Auch in diesem Modell ist die Läsionsinduktion langwierig: nach einem Jahr weisen die Tiere erste Plaques auf, ab zwei Jahren lassen sich komplizierte Veränderungen nachweisen¹³⁶. Neben der langen Zeitdauer des Experiments sind auch hier die Größe der Tiere und die durch beide Faktoren entstehenden Kosten problematisch, weshalb Thim et al. das Rapacz-Schwein mit einer kleineren Schweinerasse und Minipigs gekreuzt haben. So gelang es ihnen, in den LDLR-defizienten Minischweinen nach 18 Wochen auf Cholesterinfutter Plaques zu erzeugen¹³⁷. Auch Modelle mit Schweinen, in denen artifiziell Diabetes mellitus (DM) und mit Cholesterindiät gekoppelt atherosklerotische Veränderungen erzeugt werden, sind verfügbar¹³⁸.

In einem Versuch von van Ditzhuijzen und Kollegen wurde dieses Tiermodell zu einer Evaluierung des AbsorbTM-BRS herangezogen. Alle verwendeten Schweine waren auf einer „Fast-Food-Diät“ (neben einem erhöhten Cholesterin- und Fettgehalt war das Futter auch mit Zucker und Gallensalzen angereichert). In einigen wurde zusätzlich DM induziert, Tiere ohne DM dienten als Kontrolle. Nach neun Monaten wurden bioresorbierbare PLLA-Stents (AbsorbTM, Abbott Vascular) in die Koronarien implantiert und 3 oder 6 Monate später u.a. mittels OCT und Histologie untersucht. Unabhängig vom Diabetes wurde eine heterogene Neointima mit Lipidansammlungen, d. h. neoatherosklerotischen Veränderungen beobachtet¹³⁹. In anderen Studien an nicht-atherosklerotischen Schweinen mit implantiertem AbsorbTM fällt die Beurteilung der Einheilung des Devices positiver aus^{140,141}.

Die Evaluierung von Stents, z. B. im Rahmen von Zulassungsstudien, in gesunden Schweinen ist weitverbreitet, obwohl die klinische Relevanz im Vergleich dieser Modelle zur humanen Erkrankung zweifelhaft ist¹³⁵. Auch der Magmaris®, welcher im Rahmen des vorgestellten Versuchs verwendet wurde, wurde in gefäßgesunden Schweinen getestet und zeigte positive Ein- und Zwei-Jahres-Einheilungsergebnisse¹⁴².

4.3 Kaninchen

Neben dem Schwein gilt auch das Kaninchen zumeist als Großtiermodell der Atherosklerose^{132,143}, da es eine ausreichende Größe für die Anwendung Katheter-gestützter Verfahren hat^{144–146}. Die ersten Tierversuche der Atheroskleroseforschung wurden an Kaninchen durchgeführt und auch heute noch gilt es als eines der besten atherosklerotischen Tiermodelle¹²⁹. Als solches stellt es einen wichtigen Baustein insbesondere der präklinischen Versuche dar. Auch beim Kaninchen gibt es Linien, die aufgrund eines Gendefekts spontane Hypercholesterinämie entwickeln. Dazu zählt das Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen. Es trägt einen LDLR-Defekt und wird häufig als Modell der humanen familiären Hypercholesterinämie verwendet^{126,147}.

Das New Zealand White (NZW) Kaninchen ist die am häufigsten verwendete Kaninchenrasse. Die Tiere entwickeln keine spontanen Läsionen, reagieren jedoch auf Cholesterindiät sehr sensibel mit einem starken Anstieg des Plasmacholesterins¹⁴⁸. Bereits nach wenigen Wochen auf Cholesterindiät entstehen Veränderungen, v. a. in der Aorta, aber auch den Koronarien, Carotiden und den Femoralarterien¹²⁶. Die Morphologie der Läsionen ist dabei vom Diätplan abhängig. Hohe Cholesteringehalte bei kurzer Versuchsdauer führen zur Entstehung von *fatty streaks*, in denen Schaumzellen vorherrschen. Bei Versuchen mit niedrigerem Cholesteringehalt und längerer oder intermittierender Fütterung entstehen auch Läsionen mit fibröser Kappe, durch die Einwanderung und Proliferation von VSMCs, und Cholesterinkristallen. Gefäßverletzungen mittels Ballondenudation tragen ebenfalls zur Entstehung komplexerer Läsionen mit *lipid pool* und *fibrous cap* bei¹⁴⁹. Langzeitexperimente insbesondere bei hohem Cholesteringehalt werden durch die starke Leberbelastung, die schließlich im Leberversagen mündet, erschwert¹²⁶.

Wie das Schwein wird auch das Kaninchen in der translationalen Forschung verwendet. Aufgrund seiner Größe kann es im Rahmen der Interventionellen Kardiologie zur Evaluierung

neuartiger bildgebender Verfahren eingesetzt werden¹⁴⁴, interventionelle Therapieoptionen wie Ballons oder Stents können getestet werden¹⁴⁵ und auch zur Untersuchung medikamentöser Ansätze eignet sich das Kaninchen¹⁴⁶.

Neben den Vorteilen gibt es jedoch eine Reihe von Nachteilen. Dazu zählt die Cholesterinfütterung, die im Körper der Tiere eine entzündliche und hepatotoxische Situation bewirkt, welche als unphysiologisch und weit entfernt von der Situation im Menschen kritisiert wird^{124,129}. Dadurch sind Langzeitstudien im atherosklerotischen Kaninchenmodell mit weit fortgeschrittenen Plaques schwierig bis unmöglich¹²⁶. Die Lokalisation der Plaques ist nicht identisch mit denen des Menschen. Kaninchen entwickeln v. a. Läsionen in der Aorta und selbst wenn Veränderungen der Koronarien auftreten, sind diese Gefäße beim Kaninchen zu klein, um für Versuche der interventionellen Kardiologie geeignet zu sein¹²⁴. Obwohl der Lipidmetabolismus des Kaninchens in vielen Punkten Übereinstimmungen mit dem des Menschen zeigt, gibt es auch Unterschiede: Kaninchen-HDL ist anders aufgebaut als das des Menschen und Kaninchen auf Cholesterindiät haben ein anderes Verhältnis von VLDL/LDL zu HDL (siehe **Abbildung 3**). Außerdem ist die Aktivität der hepatischen Lipase deutlich niedriger als die des Menschen¹²⁹.

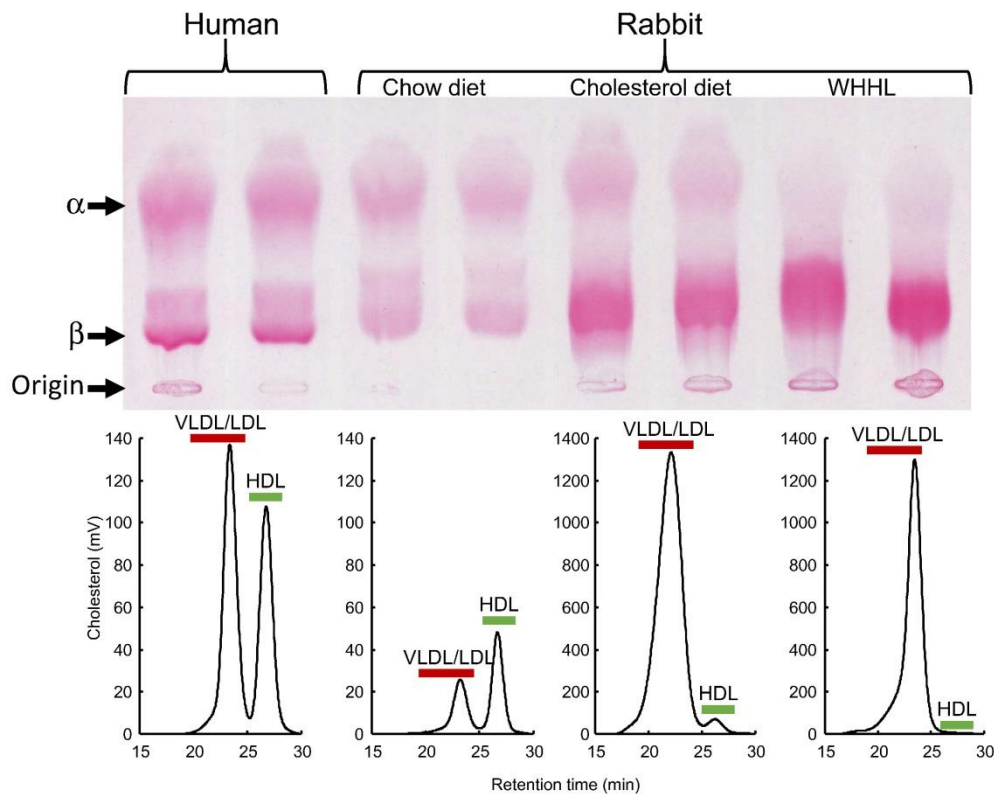


Abbildung 3: Lipoproteinprofil von Mensch und Kaninchen

Vergleich von humanem Lipoproteinprofil mit dem des Wildtyp-Kaninchens auf Normal- und Cholesterindiät sowie mit dem des WHHL-Kaninchens. Die obere Tafel zeigt das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese von Plasmalipoproteinen, darunter das Resultat der *fast protein liquid chromatography* (FPLC). Erkennbar ist die Zunahme im Bereich der β -Bande (LDL/VLDL-Bande) bei Tieren auf Cholesterindiät. Ebenso fällt der deutlich geringere Anteil an HDL am Lipoproteinprofil des Kaninchens im Vergleich zum Menschen auf.

Figure "reprinted from "Fan et al. (2015): Rabbit models for the study of human atherosclerosis. From pathophysiological mechanisms to translational medicine. In: Pharmacology & Therapeutics, Vol.146, p.104-119" with permission from Elsevier."

Die im Folgenden vorgestellte Studie ist Teil eines großen Projekts der eigenen Arbeitsgruppe. Die von Co-Doktorandin Kristina Euler durchgeführte Vorläufer-Studie befasste sich zunächst intensiv mit der Entwicklung neoatherosklerotischer Läsionen im Kaninchen und der Entwicklung eines neoatherosklerotischen Kaninchenmodells zur präklinischen Erforschung dieser Erkrankung. Für die Ausbildung atherosklerotischer Veränderungen ist die alleinige Fütterung einer Cholesterindiät ausreichend, wobei die Pathogenese vor der Stentimplantation entscheidend ist. Das Vorgehen in der Studie von Kristina Euler zur Entwicklung von Neoatherosklerose ist entsprechend komplexer. Zunächst wird durch Cholesterinfütterung eine atherosklerotische Gesamtsituation erzeugt, d. h. zum Zeitpunkt der Stentimplantation sind die Serumcholesterinspiegel der Tiere bereits erhöht, erste Veränderungen der Gefäßwände können vorliegen. Nach Implantation der Stents wird die cholesterinreiche Diät fortgeführt. Um

die Entstehung neoatherosklerotischer Läsionen zu beschleunigen, wird eine zusätzliche Schädigung des neu gebildeten Endothels mittels Denudation durchgeführt.

Um ein möglichst gutes Tiermodell zu finden, wurden in dieser Vorstudie 15 Kaninchen in drei verschiedene Versuchsgruppen à fünf Tiere eingeteilt (vgl. **Abbildung 4**). Alle Tiere erhielten zunächst ein 1%iges, gefolgt von einem 0,025%igem Cholesterinfutter. In jedes Kaninchen wurden zwei Stents in die beiden Iliakalarterien implantiert und im Rahmen einer zweiten OP der gestentete Bereich denudiert. Die Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Dauer der 1%igen Cholesterindiät und dem Zeitpunkt der 2. Denudation. OCT-Untersuchungen wurden unmittelbar nach der Euthanasie durchgeführt, bevor die Gefäße für die histologische Untersuchung aufbereitet wurden. Die Auswertung der Schnitte und der Vergleich der Gruppen ergaben, dass die Tiere der ersten Gruppe (a) die deutlichsten neoatherosklerotischen Veränderungen entwickelten.

Entsprechend wurde dieses Versuchsprotokoll verwendet und an das geplante Versuchsvorhaben angepasst (vgl. 2.1 Überblick über das neoatherosklerotische Kaninchenmodell).

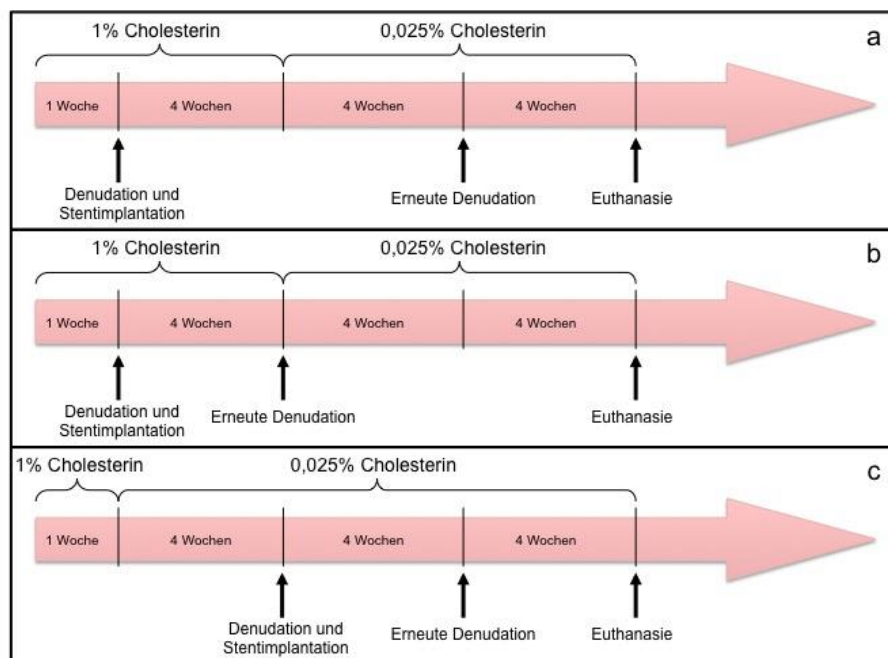


Abbildung 4: Gruppen bei der Entwicklung des neoatherosklerotischen Tiermodells

Versuchsgruppen bei der Etablierung des neoatherosklerotischen Kaninchenmodells durch Kristina Euller. Gruppe a lieferte die besten Ergebnisse und wurde für das unten vorgestellte Tiermodell in angepasster Form verwendet.

Zwischenzeitlich wurde das neoatherosklerotische Modell auch verwendet, um weitere spezifische Fragestellung hinsichtlich der Pathophysiologie der Neoatherosklerose genauer zu untersuchen. So untersuchte eine weitere Co-Doktorandin etwa gezielt die Beteiligung einer gestörten Endothelzellschicht mittels en-face Elektronenmikroskopie (die Daten werden hier nicht gezeigt, die Erkenntnisse fließen aber in die Diskussion ein).

III ZIELSETZUNG

Nachdem Kristina Euler in ihren Vorversuchen zunächst die wichtigsten Parameter des Modells definiert hat, wurde anhand dieser Erkenntnisse eine Studie konzipiert und durchgeführt, in der zwei verschiedene Stenttypen, ein bioresorbierbarer und ein permanenter, Medikamenten-freisetzender Stent, untersucht wurden.

Somit war das Ziel dieser Arbeit die Anwendung des neuen neoatherosklerotischen Kaninchenmodells, um den Einfluss der Stenteigenschaften zu untersuchen. Ein BRS sollte auf seine Fähigkeit, Neoatherosklerose zu verhindern, untersucht und mit einem DES verglichen werden. Darüber hinaus sollte der Effekt von Statinen auf diese Manifestation der Atherosklerose beobachtet und einem Placebo gegenübergestellt werden.

1 BRS und Neoatherosklerose

BRS stellen nach der Entwicklung von BMS und DES den nächsten großen Meilenstein der interventionellen Kardiologie dar. Man erhofft sich, dass dank ihrer nur vorübergehenden Beeinflussung des Gefäßes bestehende Probleme der permanenten Stents überwunden werden können. Dazu zählt auch das Auftreten von Neoatherosklerose in implantierten Stents. Einschränkungen der physiologischen Gefäßfunktionen durch den Metallkäfig des Stents und unerwünschte Wirkungen der von DES freigesetzten Medikamente werden mit dieser Problematik in Verbindung gebracht. Mit der Vommarktnahme des aus PLLA bestehenden AbsorbTM hat die BRS-Technologie jedoch in jüngster Vergangenheit einen Rückschlag erlitten. Sicherheitsbedenken beim Einsatz von BRS sind gestiegen. Intensive Untersuchungen im Rahmen von Studien werden in Zukunft fundierte Ergebnisse über die zugelassenen Modelle liefern, sind jedoch zeitaufwendig und können nicht sofort auf alle Fragen Antworten liefern. Durchgeführte Tierversuche zu komplexen Fragenstellungen können diese Erhebungen ergänzen.

Erstes Ziel des im Folgenden vorgestellten Tiermodells war deshalb der Vergleich des in Europa zugelassenen bioresorbierbaren Magnesiumstents Magmaris[®] mit einem designgleichen permanenten Metallstent. Der BRS wurde dabei auf seine Fähigkeit Neoatherosklerose zu

reduzieren untersucht, indem jedes Tier einen BRS und einen DES in die Iliakalarterien implantiert bekam. Bei diesem Ansatz handelt es sich demnach um die Evaluierung des BRS als mögliche Sekundärprävention der Neoatherosklerose.

2 Statin-Therapie und Neoatherosklerose

Der positive Effekt von Statinen auf atherosklerotische Läsionen im Rahmen der Sekundärprävention bei Humanpatienten ist wohl bekannt. Die Statin-Therapie wird sowohl für Patienten mit stabiler Angina pectoris als auch für Patienten nach überstandener Myokardinfarkt empfohlen^{61,62}. Mögliche günstige Auswirkungen auf das Voranschreiten neoatherosklerotischer Veränderungen sind denkbar; Studien, die sich mit dieser Fragestellung beschäftigen, fehlen jedoch bislang.

Der Effekt von Statinen auf die Neoatherosklerose im Tiermodell wurde als zweites Ziel dieser Arbeit beurteilt. Dazu erfolgte eine randomisierte Zuteilung von Kaninchen zur Statin-Therapie- oder zur Placebo-Gruppe und der zusätzliche Vergleich der Neoatheroskleroseausprägung zwischen diesen Gruppen.

Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass der sekundär-präventive Effekt von Statinen im Bereich nativer Koronargefäße bestens belegt ist und diese Therapie somit eine wichtige Referenz für die Evaluation von bioresorbierbaren im Vergleich zu herkömmlichen Metallstents darstellt.

IV MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Versuchstiere

Alle verwendeten Versuchstiere des im Folgenden vorgestellten Tierversuchs wurden bei der Regierung von Oberbayern im Rahmen des Tierversuchs mit dem Aktenzeichen (Az.) 55.2.1.54-2532-40-16 beantragt und genehmigt.

1.1.1 Kaninchen

Die verwendeten Kaninchen werden von Charles River Laboratories, Frankreich, für Tierversuche gezüchtet. Es handelt sich um genetisch nicht modifizierte New Zealand White Kaninchen mit einem Alter von 5-6 Monaten und einem Gewicht von 3-4 kg. Für die vorliegende Studie werden nur männliche, unkastrierte Tiere verwendet. Einerseits entwickelt sich in diesem Alter bei weiblichen Kaninchen bereits die Wamme am Hals, welche die OP-Vorbereitung und Präparation der Arteria carotis erschweren würde. Auch Wundheilungsstörungen können im schlechter durchbluteten Fettgewebe leichter auftreten. Andererseits ist bei weiblichen Tieren unter dem Einfluss von Östrogen die Plaquebildung deutlich weniger stark ausgeprägt als bei männlichen Tieren. Deshalb führen sowohl die Berücksichtigung des Versuchszieles als auch die Betrachtung von Tierschutzaspekten zur alleinigen Verwendung von Männchen.

1.1.2 Kaninchenhaltung

Die Tiere werden in einem speziellen Haltungsraum des Zentrums für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar unter konventionellen Hygienebedingungen untergebracht. Dieser ist klimatisiert mit einer Raumtemperatur von 18-21 °C, bei einer relativen Luftfeuchte von 45-65%. Mittels künstlicher Beleuchtung wird ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus aufrechterhalten. Zwischen Licht- und Dunkelphasen wird eine Dämmerlichtphase geschaltet.

Alle Kaninchen werden einzeln in Käfighaltung untergebracht, wobei die Tiere permanent akustischen, visuellen und olfaktorischen Kontakt zu ihren Artgenossen haben. Die Käfige besitzen eine Tür aus Edelstahl und Seitenwände aus Plexiglas. Die Grundfläche stellt ein gelochtes Bodenblech aus PVC dar, durch das Kot und Urin auf einen darunter befindlichen Einschub mit Sägespänen fallen können. Jeder Käfig enthält eine PVC-Konstruktion, die den Tieren gleichzeitig als zweite Ebene sowie als Unterschlupf dient.

Zwei Käfigeinheiten können bei Bedarf miteinander verbunden werden, um den Anforderungen an die Haltung von Kaninchen nach EU-Richtlinie 2010/63 zu entsprechen, die eine größere Mindestbodenfläche bei einem Gewicht von über 5 kg vorsieht.

Die Bodenbleche und Einsätze werden täglich gereinigt. Eine Nassreinigung und anschließende Desinfektion erfolgt einmal wöchentlich. Die Einschübe zum Auffangen von Kot und Urin werden zweimal wöchentlich ausgetauscht.

Über eine Nippeltränke (800-ml-Flasche mit angebrachtem Nippel) steht den Tieren jederzeit Leitungswasser zur Verfügung. Als Grundfutter erhalten die Kaninchen Pellets, die über eine Raufe ebenfalls ad libitum zur Verfügung stehen (Genaueres siehe 1.1.3 Spezialfutter). Zusätzlich erhalten die Tiere täglich frisches Heu zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Darmflora und als Beschäftigungsmaterial, sowie ein kleines Stück Karotte. Jedem Tier steht darüber hinaus ein Nageholz permanent zur Verfügung.

1.1.3 Spezialfutter

Bis zum Versuchsbeginn erhalten die Tiere ein handelsübliches pelletiertes Alleinfuttermittel.

Die Umstellung auf ein eigens angefertigtes Spezialfuttermittel (Altromin Spezialfutter GmbH; Lage) stellt den Versuchsbeginn dar. Die Pellets unterscheiden sich dabei lediglich im Cholesteringehalt von dem Standardfutter. Zu Beginn erhalten die Kaninchen eine Diät mit einem Cholesteringehalt von 1% für eine Dauer von fünf Wochen. Anschließend wird auf ein zweites Cholesterinfutter gewechselt, welches nur noch eine Cholesterinkonzentration von 0,025% aufweist. Auch dieses wird von Altromin hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der Futtermittel findet sich in **Anhang 1** (1%) und **Anhang 2** (0,025%).

1.2 **Medikamente**

Aspirin-Brausetabletten	ASPIRIN® MIGRÄNE, 500 mg, Brausetablette, Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Aspirin i.v.	ASPIRIN® I.V. 500 mg, Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektions- oder Infusionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Atipamezol	Antisedan®, 5 mg/ml, VETOQUINOL GmbH, Ravensburg
Atorvastatin	Atorvastatin Hennig® 10 mg, Filmtabletten, Hennig Arzneimittel GmbH & Co. KG, Flörsheim
Augensalbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Mit 5% Dexpanthenol, Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Buprenorphin	Buprenodale® Multidose, 0,3 mg/ml, Dechra Veterinary Products SAS, Suresnes cedex, Frankreich
Critical Care	Oxbow Animal Health, Omaha, USA
Emla®-Creme	Emla®-Creme, Lidocain und Prilocain, AstraZeneca GmbH, Wedel
Enrofloxacin	Baytril® 25 mg/ml Injektionslösung Enrofloxacin, Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Fentanyl	Fentadon®, 50 µg/ml, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Niederlande
Heparin	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, Inj.lösung, 25000 IE, ratiopharm GmbH, Ulm
Lidocain	Lidocainhydrochlorid 2%, 20 mg/ml Inj.lösung, bela-pharma GmbH & Co. KG, Vechta
Medetomidin	Sedator®, 1 mg/ml, Eurovet Animal Health BV, Bladel, Niederlande
Metamizol	Metapyrin® 500 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
NaCl	Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet., B.Braun Vet Care, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Nitroglycerin	Nitro POHL®, 5 ml, Ampullen zur Infusion, G. POHL-BOSKAMP GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt
Pentobarbital	Narcoren® Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Hallbergmoos
Propofol 1%	Narcofol® 10 mg/ml Propofol, cp-pharma GmbH, Burgdorf
Propofol 2%	Propofol®-Lipuro 20 mg/ml, Propofol 20 mg/ml 1000 mg/50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

S-Ketamin	Ketanest® S, 25 mg/ml (2 ml) Injektionslösung, Pfizer Pharma GmbH, Berlin
-----------	---

1.3 Verbrauchsmaterial

Faden Gefäßligatur	3-0 Vicryl®, Polygalactin 910, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt
Faden Unterhautnaht	4-0 Monocryl™, Poliglecaprone 25, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt
Falcon-Tubes	50 ml, Cellstar® Tubes, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Fogarty-Katheter	Fogarty®, 3Fr., 80 cm, Edwards Lifesciences LLC, Irvine, USA
Formalin 3,7%	Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%, neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Formalin 10%	Formaldehyd-Lösung 10,0%, neutral gepuffert, mit Methanol Stabilisiert, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Führungsdraht (guidewire)	Galeo, Coronary Guide Wire, Biotronik AG, Bülach, Schweiz
Gefäßschleuse	Terumo®, Fr.5, 10 cm, Terumo Corporation, Tokyo, Japan
Inflation Kit	BasixCompak™ Inflation Device, Merit Medical Systems, Inc., South Jordan, Utah, USA
Kanülen	20G und 24G, Sterican®, Einmal-Injektions-Kanüle, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kontrastmittel	Imeron® 300, 300 mg Iod/ml, Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz
Larynxmaske	v-gel®, Docsinnovent Ltd., London, UK
OCT-Katheter	Dragonfly Duo, imaging Catheter, St.Jude Medical, LightLab Imaging, Inc., Westford, USA
Swan-Ganz-Katheter	Arrow® Balloon Wedge Pressure Catheter, 5Fr. 60 cm, Arrow International, inc.; Reading, USA
Venenverweilkanüle (Braunüle)	Vasofix® Safety, 2G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

1.4 Geräte

Beatmungsgerät	Anesthesia WorkStation, Hallowell EMD, Pittsfield, USA
C-Bogen	C-Arm and Workstation, OEC 9800®, GE OEC Medical Systems Inc., Salt Lake City, USA
Cell ^F -Software für Histologie-Morphometrie-Analyse	Cell ^F , Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland
Kapnograph	Datex Ohmeda S/5 Compact Anesthesia Monitor, Datex-Ohmeda, Inc., Madison, USA
Mikroskop	BX41TF, Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Mikroskopkamera	DP74, Olympus, Tokyo, Japan
Perfusor	Perfusor® Space, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
OCT-Konsole	C7-XR™ OCT Intravascular Imaging System, St. Jude Medical, LightLab Imaging, Inc., London, UK
Poch Blutuntersuchungsgerät	Poch-100 iV Diff, Automated Hematology Analyzier, Sysmex Corporation, Kobe, Japan
Pulsoxymeter	Nonin Medical, Inc., Plymouth, USA
Power Injector	Medrad® Mark V ProVis® Angiographic system, Medrad®, Inc., One Medrad Drive Indianola, USA
Qlvus®-Software für OCT-Morphometrie-Analyse	Qlvus® Research Edition 3.0.26.0, Medis medical imaging systems bv., Leiden, NL
Wärmematte	Sanitas SHK 18 Heizkissen, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, EBA 20, Typ 2002, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

1.5 Stents

Im Rahmen des Versuchs sollte der medikamenten-freisetzende bioresorbierbare Metallstent Magmaris® (auch *DREAMS 2G* (*Drug-Eluting Absorbable Metal Scaffold*) oder RMS (*Resorbable Magnesium Scaffold*)) der Biotronik AG (Bülach, Schweiz) untersucht und mit einem DES verglichen werden.

Dieser resorbierbare Stent besteht aus einer Magnesium-Legierung. Die Streben sind quadratisch mit einer Größe von 150 x 150 µm und in einem sog. „6 crown 2 link“-Design angeordnet. Das Magnesium-Gerüst ist mit einem Überzug aus resorbierbarem PLLA versehen. Das PLLA dient als Träger von Sirolimus in einer Konzentration von 140 µg/cm². Für die einfache Implantation ist der Stent auf einem Ballon vormontiert. Im Rahmen dieses Versuchs kommt ein 3.0 x 15 mm Magmaris® zum Einsatz.

Als Vergleichsstent dient eine DES-Sonderanfertigung (Biotronik AG, Bülach, Schweiz), welche in Größe und Design dem Magmaris® entspricht. Der DES besteht aus Edelstahl (316L SS), mit einer Strebendicke von 150 x 150 µm im „6 crown 2 link“-Design. Auch der permanente Stent ist mit Sirolimus-haltigem (140 µg/cm²) PLLA beschichtet und wird in der Größe 3.0 x 15 mm für den Kaninchenversuch verwendet. **Abbildung 5** zeigt die beiden Stents vergleichend.

Stents (Magmaris®, Biotronik AG, Bülach, Schweiz) Rechnung getragen werden. So ist erst nach circa sechs Monaten die Degradation des Devices soweit abgeschlossen, dass mögliche positive Auswirkungen der Bioresorption erkennbar werden können. Der bioresorbierbare Scaffold sollte hinsichtlich seiner Fähigkeit, Neoatherosklerose zu verhindern, evaluiert werden. In einer Untergruppe sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Therapie mit Statinen positive Auswirkungen auf die Neoatheroskleroseentstehung hat. Der untersuchte BRS wurde gegen einen DES verglichen. Dieser war vom Aufbau her mit dem BRS identisch, sodass keine Einflüsse vonseiten des Designs und der Strebendicke zu erwarten waren (siehe IV, 1.5 Stents).

Es wurden 33 NZW-Kaninchen verwendet und in eine von drei Versuchsgruppen (à 11 Tiere) eingeteilt. Kaninchen in Gruppe 1 wurden bereits an Tag 91 euthanasiert und dienten damit als Referenz für die Ausprägung der Neoatherosklerose („baseline“) vor Beginn der Statintherapie. Die Tiere in Gruppe 2 erhielten ab Tag 91 täglich ein Statin per os, während die Kaninchen in Gruppe 3 stattdessen ein Placebo erhielten. Die Tiere der Gruppen 2 und 3 wurden nach 161 Tagen euthanasiert.

Alle Kaninchen bekamen ab Tag 0 ein 1%iges Cholesterinfutter. An Tag 7 erfolgte die beidseitige Denudation der Iliakalarterien mit anschließender Stentimplantation. Vier Wochen später (Tag 35) wurden die Tiere auf eine 0,025%ige Cholesterindiät umgestellt. Eine zweite Denudation der gestenteten Gefäße erfolgte an Tag 63, um die Entstehung von Neoatherosklerose zu beschleunigen. An Tag 91 wurden die Kaninchen aus Gruppe 1 euthanasiert, an Tag 161 die Tiere aus Gruppe 2 und 3. Im Rahmen der Euthanasie wurde jede A.iliaca mittels OCT untersucht und anschließend für die Histopathologie aufbereitet. Einen Überblick über den Versuchsaufbau gibt **Abbildung 6**.

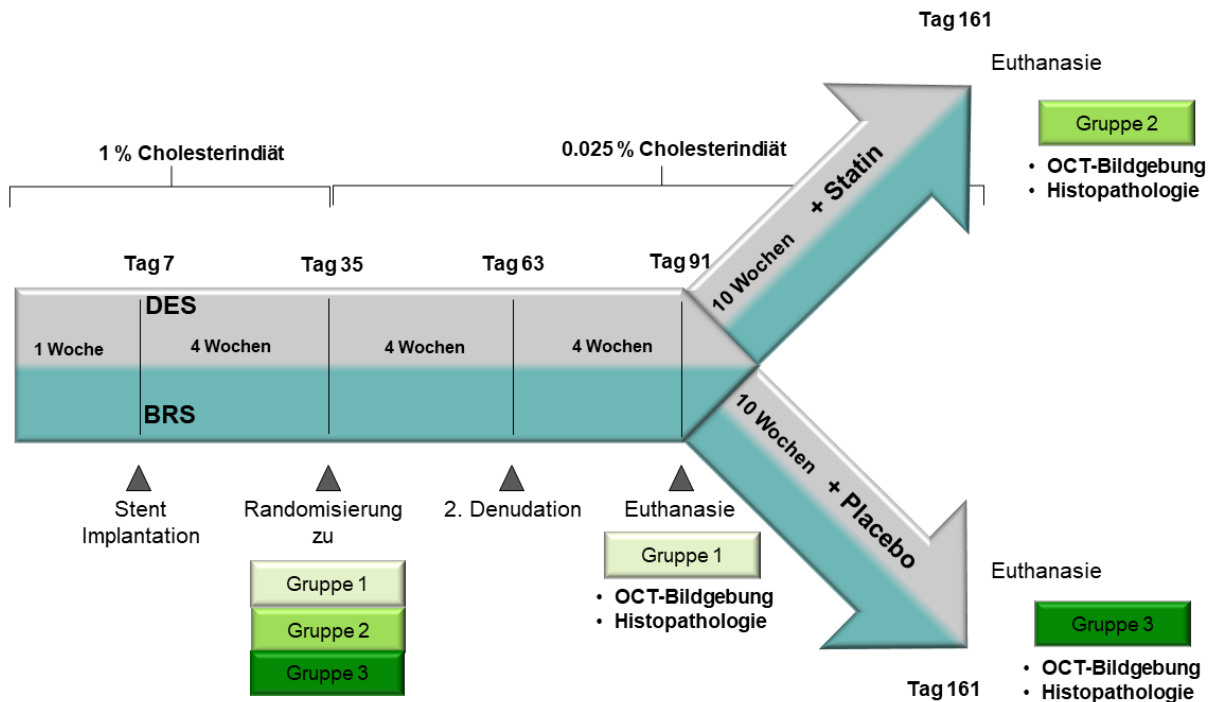


Abbildung 6: Studienaufbau

Schematischer Überblick über den Studienaufbau des neoatherosklerotischen Kaninchenmodells. Nach einer Woche auf 1%iger Cholesterindiät erhielt jedes Tier einen DES und einen BRS. An Tag 35 wurde auf ein niedrig dosiertes Cholesterinfutter gewechselt und die Tiere einer von drei Versuchsgruppen zugeteilt. Nachdem an Tag 63 eine zweite Denudation des Stentbereichs durchgeführt worden war, wurden Tiere der Gruppe 1 an Tag 91 euthanasiert. Die verbleibenden Gruppe-2-Tiere erhielten Statin, Tiere in Gruppe 3 Placebo. Sie wurden nach 161 Tagen euthanasiert.

2.1.1 Dokumentation

Für jedes Tier wurden individuelle Aufzeichnungen geführt (vgl. **Anhang 3**). Dazu zählte eine tägliche Dokumentation der Futteraufnahme bei Kaninchen auf Cholesterindiät (vgl. **Anhang 4**). Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde täglich kontrolliert. Darüber hinaus wurde dreimal wöchentlich anhand eines ausführlichen Score Sheets (vgl. **Anhang 5**) die Belastung der Versuchstiere evaluiert und dokumentiert. In der Woche nach den operativen Eingriffen wurde diese Belastungseinstufung auf ein tägliches Scoring intensiviert. Die Evaluierung im Score Sheet orientierte sich neben Parametern des allgemeinen Gesundheitszustandes (Körpergewicht, Futter- und Wasseraufnahme, Kot- und Harnabsatz, Atmung, Schleimhäute, etc.) auch an für den Versuch spezifischen Punkten, wie der Palpation der Hintergliedmaßen und deren Beurteilung auf Lahmheit, sowie die Untersuchung des Halses bzw. der OP-Wunde. Jeder Punkt wurde mit einem festgelegten Score bewertet, der sich zwischen 0 und 2 oder 0 und 3 bewegte. Score 0 entsprach dem physiologischen Zustand, Score 2 bzw. 3 bedeutete die

höchste Abweichung von der Norm. Alle vergebenen Punkte wurden addiert und ergaben die Belastung des Tieres und daran gekoppelt die Abbruchkriterien des Versuchs. Ein Gesamtscore von 0 bedeutete keine Belastung des Kaninchens. Ein Score von 1 eine geringe Belastung, bei der das Tier im Versuch verblieb, aber mindestens einmal täglich genau untersucht wurde. Score 2 ergab eine mäßige Belastung, das Kaninchen wurde tierärztlich untersucht und behandelt. Nach zwei Tagen ohne Besserung stellte dieser Zustand ein Abbruchkriterium dar, das Tier wurde euthanasiert. Score 3 symbolisierte eine starke Belastung des Versuchstiers, bei der der Versuch sofort abgebrochen werden musste. Für alle operativen Eingriffe wurden zusätzlich OP-Protokolle geführt (vgl. **Anhang 6**).

2.2 Blutentnahme und -untersuchungen

Untersuchungen von Blutproben fanden an festgelegten Tagen des Versuchszeitplans statt. EDTA-Blut wurde zur Erstellung eines kleinen Blutbildes herangezogen, Serum zur Bestimmung des Cholesterinspiegels und der Leberenzyme.

Die Blutuntersuchungen dienten zum einen der Kontrolle des Allgemeinbefindens, zum anderen der Überprüfung der Leberenzyme, da Kaninchen auf Cholesterindiät anfällig für die Entwicklung eines Leberversagens sind. Untersucht wurden dazu die Werte von Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) und Glutamatdehydrogenase (GLDH), außerdem die Höhe der Serumgallensäuren (SGS). Zusätzlich wurde der Serum-Cholesterinspiegel bestimmt.

2.2.1 Blutentnahmen

Das Versuchsprotokoll sah eine erste Blutentnahme vor Beginn der Cholesterindiät vor. Diese wurde als „Tag -1“ bezeichnet. Sie fand nach der Eingewöhnungszeit der Kaninchen in der Woche vor Beginn der Cholesterinfütterung statt. Sie lieferte *baseline*-Werte und diente dem Ausschluss von möglichen bereits vorliegenden Erkrankungen der Leber.

Die Blutentnahmen an Tag 7, Tag 63 und Tag 91 (Gruppe 1) bzw. Tag 161 (Gruppe 2 und 3) fanden jeweils im Zuge der OP- bzw. Euthanasie-Vorbereitung statt. Hierbei erhielten die Tiere eine Ohrbraunüle (Venenverweilkatheter, VVK), über welche vor Narkoseeinleitung Blut entnommen wurde. Bei manchen Tieren war die Blutgewinnung aus der V. auricularis lateralis

über den VVK ein sehr langwieriges Unterfangen. Bei diesen Tieren war auch eine Blutentnahme aus der Gefäßschleuse, welche während der OP in die A.carotis eingebracht wurde möglich, um den Stress der Tiere während der OP-Vorbereitung so gering wie möglich zu halten.

An Tag -1, Tag 35, und für die Kaninchen der Gruppe 2 und 3 zusätzlich an Tag 91 und an Tag 126, fanden zeitgleich keine weiteren Eingriffe an den Tieren statt. An diesen Tagen erfolgte die Blutentnahme nach Schur eines kleinen Bereichs am Hinterbein aus der Vena saphena lateralis. So war eine Schonung der im Rahmen der operativen Eingriffe bereits viel beanspruchten Ohrrendvenen möglich (siehe **Abbildung 7**).

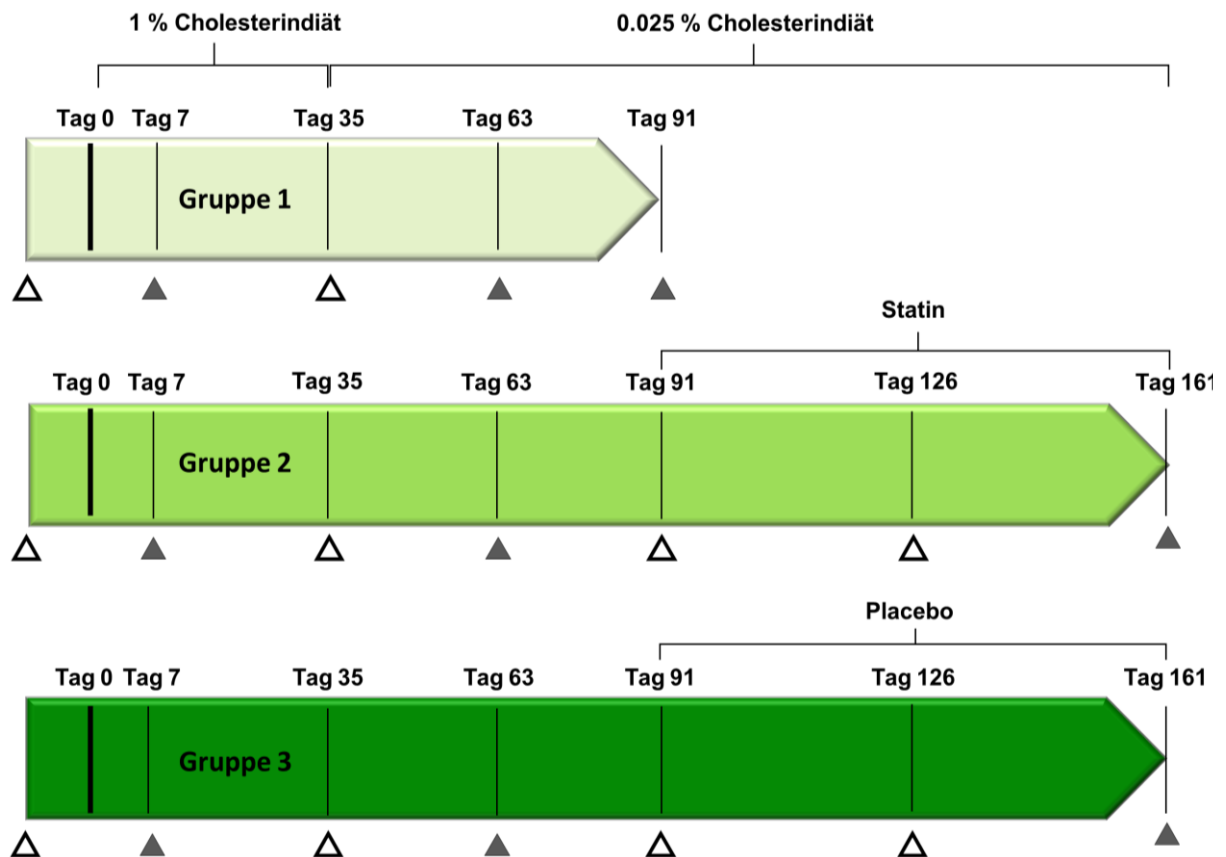


Abbildung 7: Blutentnahmen

Blutentnahmen/-untersuchungen wurden an den mit Dreieck markierten Versuchstagen durchgeführt. Bei △ handelt es sich um Blutentnahmen aus der V.saphena an der Hintergliedmaße, bei ▲ um Blutentnahmen im Rahmen von Eingriffen aus dem VVK oder der Gefäßschleuse.

2.2.2 Blutuntersuchungen

Die Untersuchung der EDTA-Blutproben zur Bestimmung des kleinen Blutbilds erfolgte vollautomatisch an einem Poch Blutuntersuchungsgerät (Sysmex Corporation, Kobe, Japan).

Die Bestimmung von Cholesterin, AST, ALT, gamma-GT und GLDH, und SGS wurde durch SYNLAB Augsburg durchgeführt. Zur Gewinnung des Serums wurde die Vollblutprobe nach ausreichender Gerinnungszeit abzentrifugiert, anschließend der Überstand, das Serum, abpipetiert und in ein sauberes Probenröhrchen verbracht. Das Material wurde täglich mittels Kurier von SYNLAB Augsburg zur Bestimmung des Serum-Cholesterin-Werts und der Leberenzyme abgeholt.

2.3 OP-Vorbereitung

Im Rahmen der OP-Vorbereitung wurden alle Kaninchen zunächst einer gründlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen und gewogen.

Anschließend wurde die Vena auricularis lateralis intensiv mit Emla-Creme (AstraZeneca GmbH, Wedel) eingerieben, wodurch eine Vasodilatation sowie leichte Lokalanästhesie eintrat. Das Kaninchen wurde durch eine Hilfsperson leicht gehalten. Diese staute gleichzeitig auch die Ohrtrandvene, in welche dann ein VVK gelegt und gründlich befestigt wurde. Aus diesem konnte nun die Blutentnahme erfolgen.

Je nachdem, welches Anästhesieverfahren zum Einsatz kam (siehe IV, 2.4), unterschied sich die weitere OP-Vorbereitung.

Bei beiden Anästhesie-Verfahren wurden die Kaninchen jedoch in Rücklage auf dem OP-Tisch gelagert, wobei insbesondere die gestreckte Lagerung des Kopfes entscheidend war. Die Tiere wurden seitlich stabilisiert und über eine Wärmematte (Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler) warmgehalten. Die Kornea wurde mittels Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) vor dem Austrocknen geschützt.

Anschließend erfolgte die Rasur und Desinfektion des OP-Feldes am Hals des Tieres.

Alle Tiere erhielten Aspirin (40 mg/Tier i.v., Bayer Vital GmbH, Leverkusen) zur Antikoagulation, außerdem wurden sie mit Enrofloxacin 10 mg/kg KGW s.c. (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) perioperativ antibiotisch abgedeckt.

2.4 Anästhesieprotokolle

Das ursprünglich bei der Regierung beantragte Narkoseregime sah eine Propofol-Narkose mit Beatmung über Larynxmaske vor. Im Laufe des Projekts wurde im Sinne des Refinements ein alternatives Narkoseregime bei der Regierung beantragt, da im Zuge mehrerer Narkosen Probleme im Rahmen der Propofol-Narkose aufgetreten waren. Obwohl diese Narkose gut steuerbar ist und den Vorteil einer kurzen Nachschlafphase bietet, musste das Anästhesieprotokoll geändert werden, da durch das Verrutschen der Larynxmaske Narkosezwischenfälle aufgetreten waren.

Solange sich das Kaninchen in Brustlage befand, schloss die Larynxmaske relativ dicht und das Tier konnte effektiv beatmet werden. Häufig kam es jedoch im Rahmen der Rückenlagerung zu einer nicht mehr optimalen Abdichtung des Larynx durch die Maske. Repositionierungsversuche der Maske waren, wenn überhaupt, nur kurz erfolgreich. Aufgrund der Kürze des operativen Eingriffs von ca. 30-40 Minuten wurde das Anästhesieverfahren dann auf eine Medetomidin-S-Ketamin-Narkose umgestellt, bei welcher die Tiere spontan atmeten und somit auf die Platzierung der Larynxmaske verzichtet werden konnte. Die Kaninchen wurden aber weiterhin ständig mittels Nasensonde mit Sauerstoff versorgt.

2.4.1 Propofol-Narkose

Das initial bei der Regierung, im Rahmen des zugrunde liegenden Tierversuchsantrags (TVA), beantragte Narkoseprotokoll sah eine Propofol-Narkose mit maschineller Beatmung der Kaninchen während der Narkose vor.

Die Narkoseeinleitung erfolgte über einen Propofol-Bolus (Propofol 1%, Narcofol® 10 mg/ml Propofol, cp-pharma GmbH, Burgdorf) nach Wirkung bis zum Ausfall des Schluckreflexes. Nun wurde die Zunge gefasst und kranial gezogen, während eine Hilfsperson den Kopf des Tieres fixierte und mittels eines Gazezügels streckte. Dann konnte die Larynxmaske (v-gel®, Docsinnovent Ltd., London, UK) vorgeschoben und deren korrekter Sitz kontrolliert werden.

Nach Befestigung der Larynxmaske mittels eines Stücks Mullbinde wurde das Tier in den OP gebracht und an die Beatmung angeschlossen.

Über die Ohrbraunüle wurde Propofol 2% (Propofol-®Lipuro 20 mg/ml, Propofol 20 mg/ml 1000 mg/50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) zur Aufrechterhaltung der Narkose mittels Perfusor bedarfsangepasst appliziert (100-150 mg/kg/h).

Die Analgesie intra-OP erfolgte über Fentanyl 0,01 mg/kg KGW i.v. (Fentadon®, 50 µg/ml, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, NL).

2.4.2 Medetomidin/S-Ketamin-Narkose

Das zweite, nachträglich bei der Regierung beantragte Narkoseprotokoll sah eine Medetomidin-S-Ketamin-Narkose vor, bei der die Kaninchen selbstständig atmeten.

Für diese Narkose wurden Medetomidin 0,25 mg/kg KGW (Sedator®, 1 mg/ml, Eurovet Animal Health BV, Bladel, NL) und S-Ketamin 17 mg/kg KGW (Ketanest® S, 25 mg/ml (2 ml) Injektionslösung, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) in der Mischspritze aufgezo- gen und dem Kaninchen in die hintere Oberschenkelmuskulatur injiziert, woraufhin es für die Einschlafphase in eine dunkle Box verbracht wurde.

Die analgetische Abdeckung des Tieres erfolgt für den minimal-invasiven Eingriff über die Gabe von Metamizol 40 mg/kg KGW i.v. (Metapyrin® 500 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg) über die Ohrbraunüle. Zum Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde vor dem Hautschnitt zusätzlich Fentanyl 0,005 mg/kg KGW i.v. (Fentadon®, 50 µg/ml, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, NL) verabreicht.

Während des gesamten operativen Eingriffs atmete das Kaninchen selbstständig und wurde über eine Nasensonde mit Sauerstoff versorgt. Die Überwachung erfolgte mittels eines Pulsoxymeters.

2.5 Operation 1: Denudation und Stent-Implantation

Sieben Tage nach Fütterungsbeginn wurden im Rahmen der ersten Operation (OP1) zunächst die Denudationen durchgeführt und anschließend die Stents implantiert.

Der Zugang erfolgte für OP1 über die linke A.carotis communis, die dafür freipräpariert wurde. Mit einem Skalpell wurde zunächst ein circa 2 cm langer Hautschnitt auf der linken Halsseite lateral der Trachea vorgenommen. Anschließend mussten die oberflächlichen Muskeln des Halses sowie die Faszie stumpf getrennt werden, bevor die Faszie der tiefen Halsmuskulatur durchtrennt und in die Tiefe präpariert werden konnte. Die A.carotis communis und der Nervus vagus wurden dargestellt und der Nerv vorsichtig von der Carotis getrennt (siehe **Abbildung 8**).

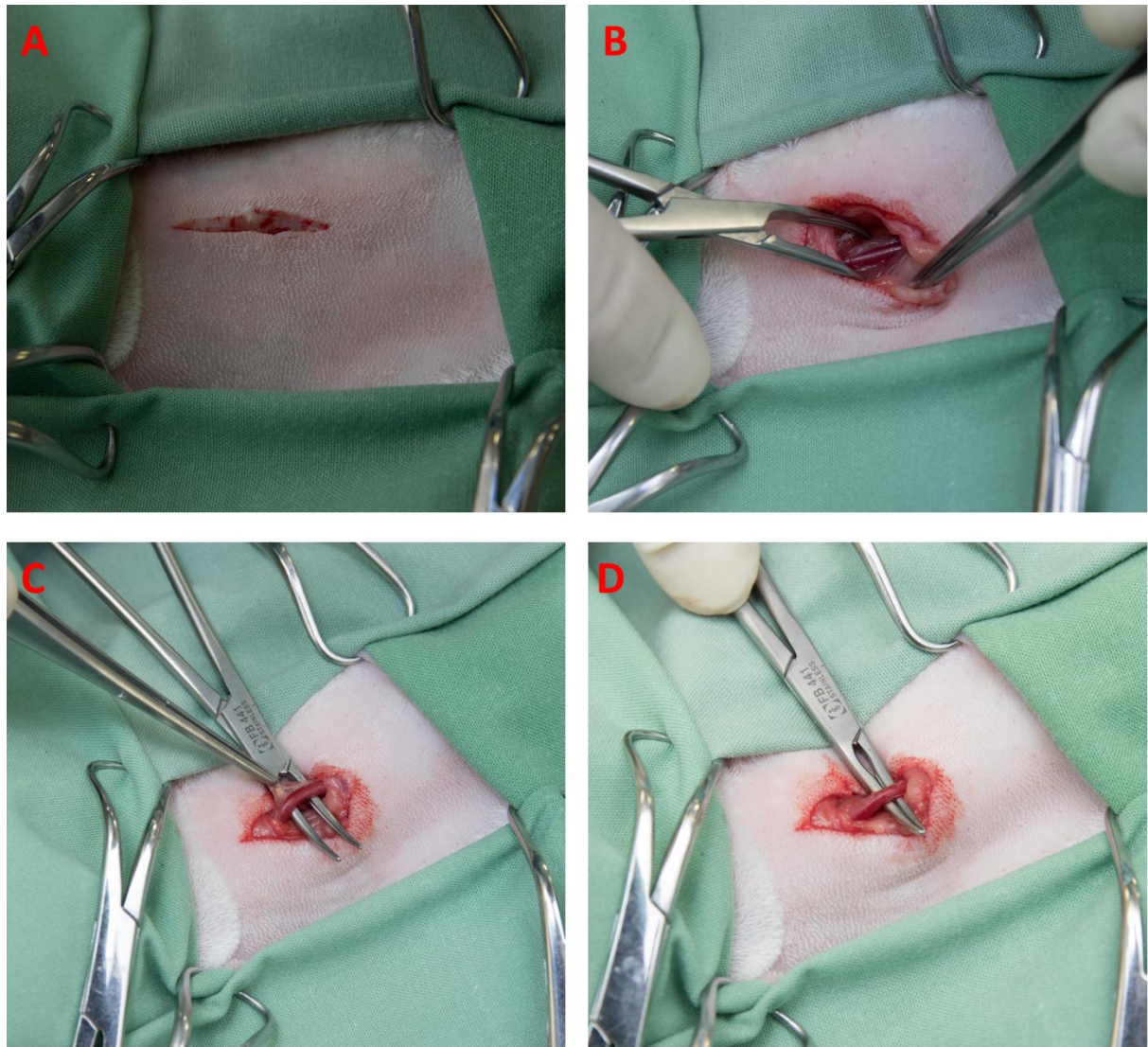


Abbildung 8: Präparation der Arteria carotis

In einem etwa 2 cm langen Hautschnitt (8A) wurde in die Tiefe präpariert, bis sich das gesuchte Gefäß darstellte (8B). Der Nervus vagus, in 8C mit einer Klemme gefasst und zur Seite gezogen, wurde vorsichtig von der Arterie getrennt und diese für den Gefäßzugang dargestellt (8D).

Das Gefäß wurde im proximalen Bereich angeschlungen und distal ligiert. Im Anschluss wurde es mit einigen Tropfen Lidocain (Lidocainhydrochlorid 2%, 20 mg/ml Inj.lösung, bela-pharma

GmbH & Co. KG, Vechta) befeuchtet, wodurch eine Vasodilatation erzielt wurde. Nun wurde mit einer Mikrodissektionsschere eine kleine Inzision gesetzt. Durch diese wurde eine 5French Gefäßschleuse (Terumo®, Fr.5, 10 cm, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) herzwärts ins Gefäßlumen eingebracht und mit einer Klemme fixiert (vgl. **Abbildung 9**).

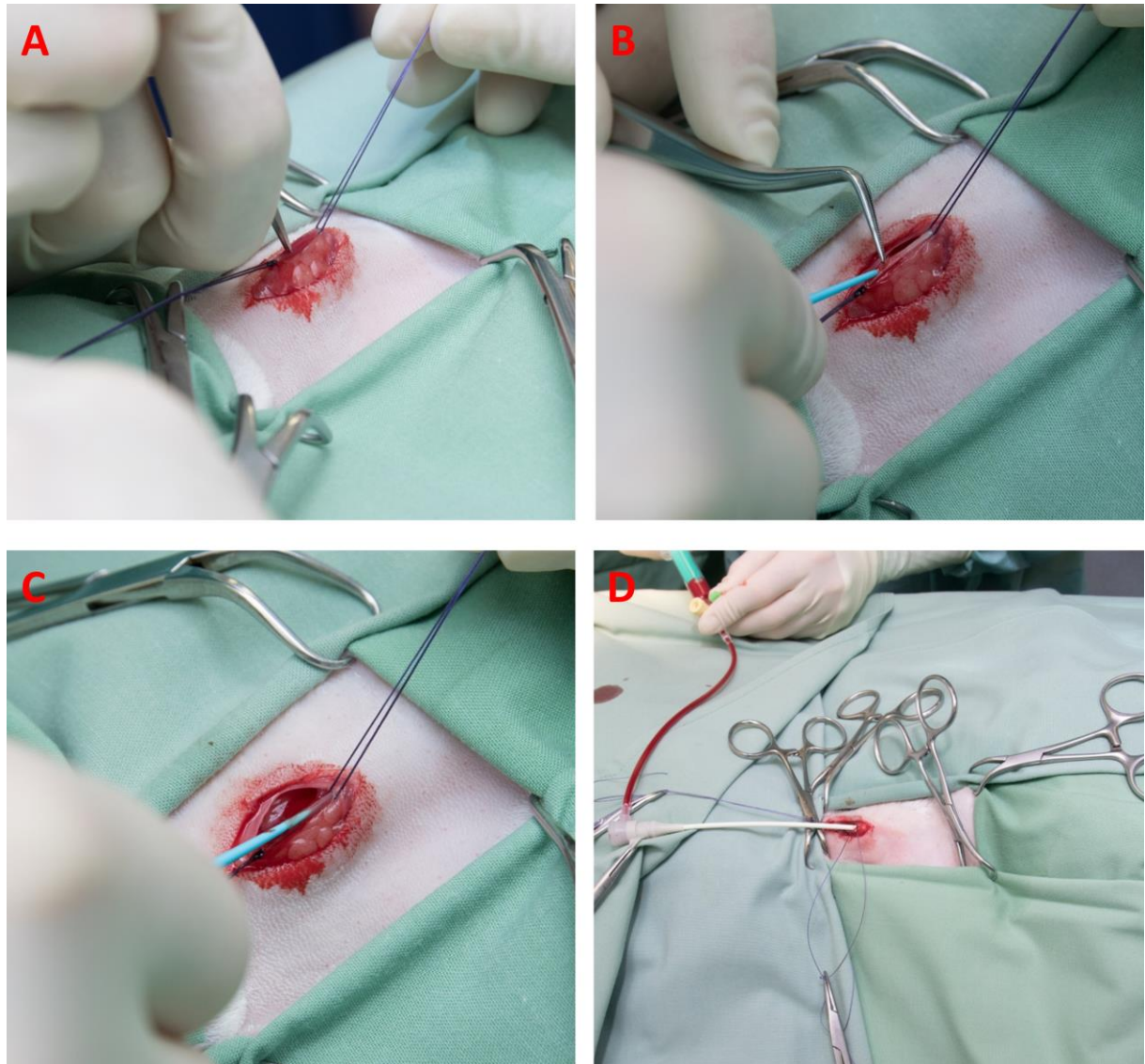


Abbildung 9: Einbringen der Gefäßschleuse

Die Arterie wurde distal mit einem Faden abgebunden und proximal angeschlossen, bevor eine kleine Inzision gesetzt wurde (9A), welche mittels Pinzette vorsichtig aufgeweitet und die Öffnung dargestellt wurde (9B). Anschließend wurde eine 5F Gefäßschleuse herzwärts ins Lumen eingebracht (9C) und fixiert (9D).

Sobald die Schleuse eingeführt wurde, erhielt das Kaninchen als weitere Antikoagulation Heparin 150 IE/kg KGW i.v. (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, Inj.lösung, 25000 IE, ratiopharm GmbH).

Ein Swan-Ganz-Katheter (Arrow® Balloon Wedge Pressure Catheter, 5Fr. 60 cm, Arrow International, inc.; Reading, USA) wurde über die Gefäßschleuse ins Lumen der A.carotis und über den Aortenbogen bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Nun wurde ein initiales Angiogramm erstellt. Für dieses und auch für das Kontrollangiogramm kam ein 1:3 mit heparinisierten Ringerlösung verdünntes Kontrastmittel (Imeron® 300, 300 mg Iod/ml, Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz) zum Einsatz. Auf der initialen Angiografie-Aufnahme wurden die Aortenbifurkation, die Abzweigung der A.iliaca interna von der A.iliaca communis auf jeder Seite, sowie der Punkt an dem die A.iliaca externa als A.femoralis in die Gliedmaße abbiegt markiert (siehe **Abbildung 10**). Diese Punkte dienten dem Operateur zur Orientierung und zur Kontrolle der korrekten Positionierung bei der Denudation und anschließenden Implantation des Stents.

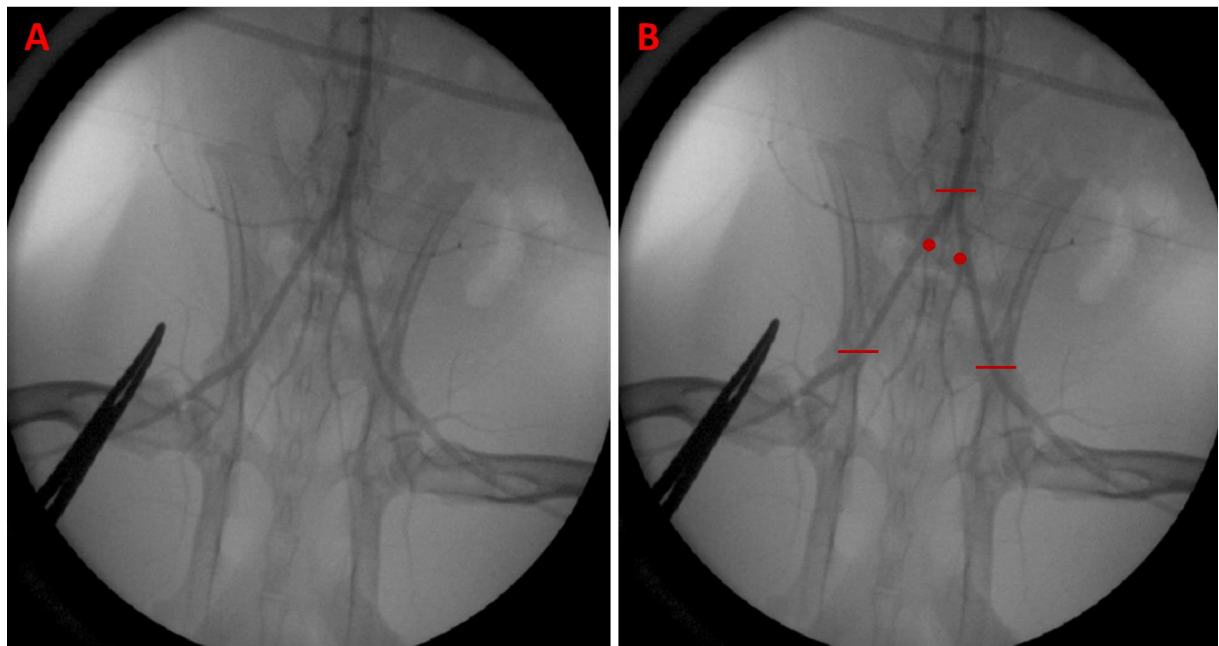


Abbildung 10: Initiales Angiogramm

Initiales Angiogramm (10A) mit Markierung der für den Operateur entscheidenden Orientierungspunkten (10B) (obere Linie = bifurcatio aortae, untere Linie = Übergang von A.iliaca in A.femoralis, Punkte = Abzweigungen der A.iliaca interna), aus denen sich der Implantationsort für die Stents ergibt.

Währenddessen wurde der Swan-Ganz-Katheter wieder entfernt und der Führungsdraht (Galeo, Coronary Guide Wire, Biotronik AG, Bülach, Schweiz) vorsichtig vorgeschoben. Ebenso wie beim Einführen des Swan-Ganz-Katheters erfolgte dies unter Angiografie-Kontrolle, sodass der Operateur jederzeit das korrekte Vorschieben des Drahtes kontrollieren und ein unerwünschtes Einführen in andere Gefäße, wie etwa die A.renalis, vermeiden konnte. Der

Führungsdraht wurde ausgehend von der Arteria carotis, über den Arcus aortae und die Aorta abdominalis durch die A.iliaca bis in die A.femoralis geschoben. Nun diente der Führungsdraht als Leitschiene beim Einführen des 3F Fogarty-Katheters (Fogarty®, 3Fr., 80 cm, Edwards Lifesciences LLC, Irvine, USA). Dieser wurde am distalen Ende der A.iliaca positioniert, der Ballon mit Kontrastmittel-Gemisch vorsichtig dilatiert und unter Angiografie-Kontrolle von distal nach proximal bis kurz vor die bifurcatio aortae gezogen. Dieser Vorgang wurde wiederholt und so die Denudation des Gefäßabschnittes erreicht.

Der Fogarty-Katheter wurde anschließend entfernt und der zu implantierende Stent bis in die Iliakalarterie eingeführt. Der Operateur kontrollierte die korrekte Positionierung des Stents. Der Stent war auf einem Ballon vormontiert und durch Dilation mit Kontrastmittel wurde der Stent in die Gefäßwand expandiert. Dabei wurde ein Stent-abhängiger Druck durch das Inflation-Kit (Merit Medical Systems, Inc., South Jordan, Utah, USA) aufgebaut und für 30 Sekunden aufrechterhalten.

Der BRS (Magmaris®, Biotronik AG, Bülach, Schweiz) wurde mit einem Druck von 10 atm und der DES (Biotronik AG, Bülach, Schweiz) mit 12 atm expandiert. Die Implantation der beiden Stenttypen in die Iliakalarterien erfolgte randomisiert (für eine Übersicht über die Implantationsmatrix vgl. **Anhang 7**). Der Operateur war für den implantierten Stenttyp verblindet.

Die Vorgänge im Rahmen der Stentimplantation, wie sie mittels Angiografie erfasst wurden, sind in **Abbildung 11** zusammengefügt.

Nach der Stent-Implantation auf der ersten Seite wurde das Vorgehen wie oben beschrieben auf der anderen Seite wiederholt, bevor erneut der Swan-Ganz-Katheter eingebracht und ein Kontroll-Angiogramm angefertigt wurde. Dieses diente dem Ausschluss von Komplikationen, wie Gefäßdissektionen, akuten Verschlüssen oder Verrutschen des Stents (vgl. **Abbildung 12**).

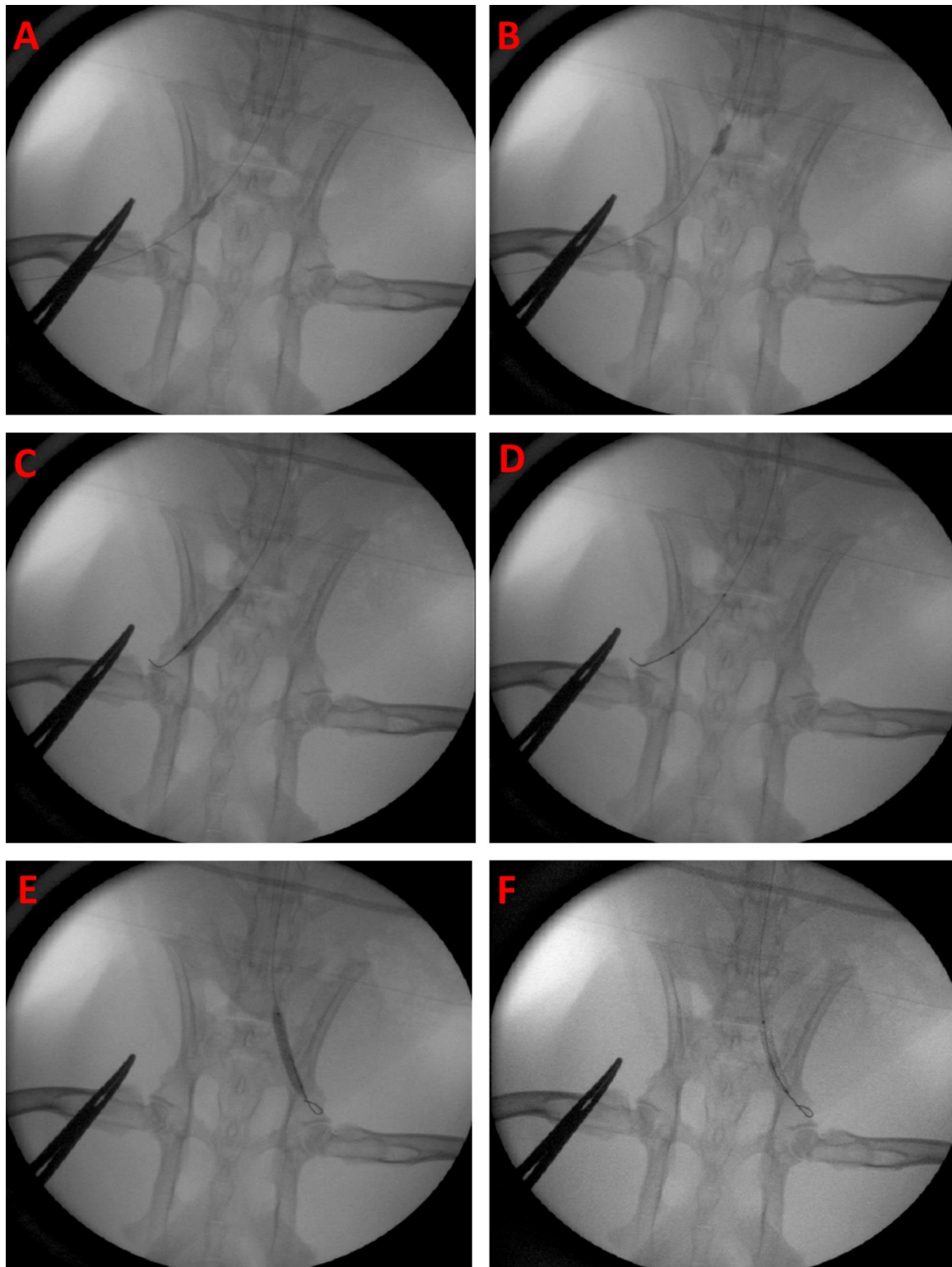


Abbildung 11: Vorgang der Stentimplantation

Zunächst wurde die A.iliaca mittels Kontrastmittel gefühltem Ballon denudiert (11A), dabei wurde der Ballon zweimal vom distalen Ende der Arterie bis zur Aortenbifurkation gezogen (11B). Anschließend wurde der erste Stent, hier der BRS, implantiert, indem der Ballon, auf welchem der Stent vormontiert ist, mit Kontrastmittel-Ringer-Mischung aufgepumpt wurde (11C). Der Ballon wurde entleert (11D) und anschließend vorsichtig aus dem implantierten Stent entfernt. Auf die gleiche Weise wurde in der kontralateralen Iliaca nach Denudation der zweite Stent, hier der DES, implantiert (11E) und der Ballon entleert (11F), bevor alle Drähte entfernt werden konnten. Die röntgendichten Marker des BRS sind im Gegensatz zum Gerüst des DES kaum erkennbar.

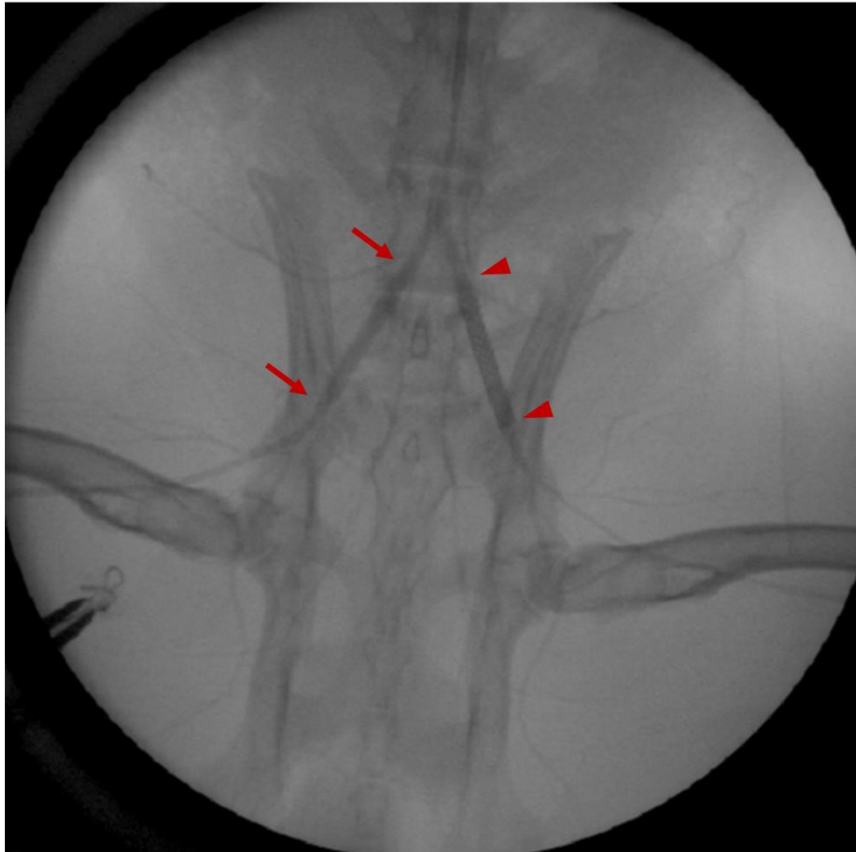


Abbildung 12: Zustand nach beidseitiger Stentimplantation

Das abschließende Kontrollangiogramm nach Implantation des BRS in die RIA und DES in die LIA: Es sind keine Auffälligkeiten erkennbar. Der BRS ist mit Pfeilen markiert, der DES mit Pfeilspitzen.

Zuletzt wurden alle Katheter aus der A.carotis entfernt und nun auch der bislang lediglich angeschlungene, proximale Faden verknotet. Die Muskulatur wurde mittels Einzelheft adaptiert und der Hautschnitt durch eine Intrakutan-Naht verschlossen.

2.6 Operation 2: Denudation

Das Vorgehen im Rahmen der zweiten OP (OP2) deckte sich zu großen Teilen mit demjenigen bei OP1. Lediglich die Stent-Implantation entfiel.

Der Zugang erfolgte diesmal über die rechte Halsseite und Carotis. Diese wurde, wie unter 2.5 beschrieben, freipräpariert, eröffnet und eine 5F Gefäßschleuse eingebracht. Der eingeführte Swan-Ganz-Katheter wurde über den Aortenbogen in die Aorta abdominals vorgeschoben und ein Angiogramm erstellt. Darauf wurden die röntgendichten Markierungen des BRS für die Denudation markiert. Das Metallgerüst des DES war jederzeit leicht erkennbar.

Danach wurde der Swan-Ganz-Katheter über den Führungsdraht durch den Fogarty-Ballonkatheter ersetzt. Dieser wurde direkt im Stentbereich platziert und mit einem Druck von 10 atm mit Kontrastmittel-haltiger Lösung aufgepumpt. Die korrekte Positionierung wurde unter Durchleuchtung kontrolliert. Im Rahmen der 2. OP wurde auf die zusätzliche Bewegung des Ballons entlang der Gefäßwand verzichtet, da im bereits atherosklerotisch veränderten Gewebe eine stark erhöhte Gefahr von Gefäßverletzungen und unkontrollierten Blutungen bestand.

Nachdem auf beiden Seiten die Denudation erfolgreich durchgeführt wurde, wurden Rupturen und Dissektionen mittels Angiogramm ausgeschlossen. Drähte und Gefäßschleuse wurden entfernt und auch die rechte A.carotis permanent ligiert. Schließlich wurde die Halswunde wie oben beschrieben verschlossen.

2.7 Post-operatives Management

Nach Abschluss des Eingriffs, jedoch frühestens 45 Minuten nach Einleitung, wurde die Narkose durch die Gabe von Atipamezol (1,25 mg/kg KGW s.c., Antisedan®, 5 mg/ml, VETOQUINOL GmbH, Ravensburg) teilantagonisiert, um die Nachschlafphase möglichst kurz zu halten.

Alle Tiere wurden post-OP über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Buprenorphin in einer Dosierung von 0,01 mg/kg KGW s.c. (Buprenodale® Multidose, 0,3 mg/ml, Dechra Veterinary Products SAS, Suresnes cedex) analgetisch abgedeckt.

In der Aufwachphase wurden die Kaninchen in abgedunkelten Käfigen auf Wärmematten gelagert und mittels Pulsoxymeter kontrolliert. Bis die Tiere die Sauerstoffsättigung selbstständig halten konnten, wurden sie mit Sauerstoff versorgt. Anschließend wurden sie in den Kaninchenhaltungsraum zurückgebracht, wo sie noch mehrere Stunden nach der OP unter engmaschiger Beobachtung standen.

Die ersten sieben Tage post-OP wurden die Tiere täglich klinisch untersucht und gewogen.

Nach der OP und bis zum Ende des Versuchs erhielten die Tiere täglich Aspirin per os (40 mg/Tier, ASPIRIN® MIGRÄNE, 500 mg, Brausetablette, Bayer Vital GmbH; Leverkusen).

2.8 Gruppeneinteilung und Randomisierung

Das Studiendesign sah eine Einteilung der Tiere in eine von drei Gruppen à 11 Kaninchen vor.

Gruppe 1 stellte die *Baseline*-Gruppe dar. Diese Kaninchen wurden bereits nach 91 Tagen euthanasiert und unmittelbar post-mortem die OCT-Bildgebung durchgeführt. Anschließend wurden die Stents entnommen und für die histologische Untersuchung aufbereitet. So wurde das Ausmaß der Neoatherosklerose vor Beginn der Statintherapie ausgewertet, um das Voranschreiten der Neoatherosklerose beurteilen und den Effekt der Statin-Therapie im Gegensatz zur Placebo-Gruppe evaluieren zu können.

Die Kaninchen in Gruppe 2 wurden ab Tag 91 mit Atorvastatin behandelt, während die 11 Tiere in Gruppe 3 stattdessen lediglich ein Placebo erhielten.

Die Zuteilung der Tiere in die jeweilige Gruppe erfolgte anhand der Cholesterinwerte. Aus den Werten an Tag 7 und 35 wurde die Differenz errechnet und dieses Delta für das „*Matching*“ der Kaninchen herangezogen. Im Rahmen des „*Matchings*“ wurden jeweils drei Tiere mit möglichst ähnlichen Cholesterinwerten in eine Untergruppe gegliedert. Aus diesen 11 resultierenden Untergruppen erfolgte dann eine randomisierte Zuteilung der Tiere auf Gruppe 1, 2 und 3. Durch das „*Matching*“ sollte eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Tiere erreicht werden. Insbesondere Kaninchen mit sehr hohen und sehr niedrigen Serum-Cholesterinwerten waren so ausgewogen auf die Gruppen verteilt.

Außerdem konnte in diesem Zusammenhang auch die Kontrolle auf sog. „*Non-Responder*“ erfolgen. Damit sind Tiere gemeint, die auf die Cholesterindiät bis zur Blutuntersuchung an Tag 35 keine ausreichend hohen Serum-Cholesterinwerte erreicht haben. Ein Wert von 500 mg/dl (entspricht 27,75 mmol/l) an Tag 35 wurde dabei als Schwellenwert angesehen. Tiere mit niedrigerem Cholesterinwert hätten für diese Studie nicht verwendet werden können.

2.9 Atorvastatin-Therapie vs. Placebo

Kaninchen der Gruppe 2 erhielten ab Tag 91 täglich Atorvastatin, einen Cholesterinsenker aus der Gruppe der Statine, in einer Dosierung von 3 mg/kg KGW per os (Atorvastatin Hennig® 10 mg, Filmtabletten, Hennig Arzneimittel GmbH & Co. KG, Flörsheim). Dazu wurden die Tabletten in einem Mörser zu Pulver zermahlen und anschließend in Leitungswasser gelöst. Nun konnte

die Lösung den Tieren über eine 1-ml-Spritze eingeflößt werden. Die Atorvastatin-Therapie sollte von Tag 91 bis zur Euthanasie an Tag 161 durchgeführt werden.

Die Tiere in Gruppe 3 erhielten stattdessen auf dem gleichen Applikationsweg Leitungswasser als Placebo.

2.10 Finaler Eingriff und Euthanasie

Die Euthanasie der Versuchstiere in Gruppe 1 fand 91 Tagen nach Diätbeginn statt. Tiere in Gruppe 2 und 3 wurden nach 161 Tagen euthanasiert.

Die Vorbereitung der Kaninchen erfolgte analog der OP-Vorbereitung (siehe IV, 2.3). Die Tiere erhielten einen VVK in die Vena auricularis lateralis und wurden dann mittels Medetomidin-S-Ketamin in Narkose gelegt. Die Lagerung erfolgte in Rückenlage, eine Überwachung der Tiere wurde mittels Pulsoxymeter durchgeführt. Das Abdomen und die Innenseite der Oberschenkel wurden großflächig rasiert.

Die Analgesie während des finalen Eingriffs erfolgte über Metamizol in einer Dosierung von 200 mg/kg KGW i.v., sowie Fentanyl nach Bedarf (0,005-0,01 mg/kg KGW vorsichtig i.v.). Außerdem erhielten die Tiere analog zu den operativen Eingriffen Aspirin i.v. 40 mg/Tiere zur Antikoagulation.

Der Zugang erfolgte über einen Bauchschnitt in der Linea alba vom Sternum bis zur Beckensymphyse. Die Darmschlingen wurden vorsichtig vorgelagert. Die Präparation von Aorta abdominalis und Vena cava caudalis erfolgte hauptsächlich stumpf. Sobald beide Gefäße freipräpariert waren, wurden sie jeweils proximal und distal angeschlungen und so für das Einbringen der 5F-Gefäßschleusen vorbereitet. Nun wurde zunächst die Vena cava proximal ligiert, anschließend mit einer Mikrodissektionsschere eine Inzision gesetzt und daraufhin die Schleuse eingebracht. Anschließend wurde das Prozedere bei der Bauchaorta wiederholt und zuletzt beide Schleusen gründlich befestigt. Danach wurde Heparin 150 IE/kg KGW direkt in die Aorta verabreicht.

Vor der Euthanasie wurde eine letzte Angiografie durchgeführt und anschließend Nitroglycerin 3 µg/kg KGW (Nitro POHL®, G. POHL-BOSKAMP GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt) über die

Gefäßschleuse in die Aorta eingebracht. Es reduziert das Auftreten von Vasospasmen im Zuge der OCT-Untersuchung.

Die Euthanasie erfolgte mittels Pentobarbital 300 mg/kg KGW i.v. über die Ohrbraunüle. Das Eintreten des Todes wurde durch gründliche Auskultation bestätigt.

2.11 Optical Coherence Tomography (OCT)

Sobald der Tod des Kaninchens festgestellt wurde, konnte die OCT durchgeführt werden. Um die nötige Blutfreiheit zu erreichen, wurde NaCl-Lösung 0,9% (Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet., B. Braun Vet Care, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) über die Aortenschleuse eingebracht und das Blut über die Cava-Schleuse herausgespült, bis die austretende Flüssigkeit klar war. Nun wurde ein Führungsdraht in die erste Iliakalarterie eingebracht und bis in die A.femoralis vorgeschoben.

Die Durchführung der OCT erfolgte mit einer St. Jude OCT-Konsole (C7-XR™ OCT Intravascular Imaging System, St. Jude Medical, LightLab Imaging, Inc., London, UK) anhand einer Standard Operation Procedure (SOP).

Der OCT-Katheter wurde mit der im Set enthaltenen Spritze mit unverdünntem Kontrastmittel gespült und an der dafür vorgesehenen Stelle auf den Führungsdraht aufgefädelt (vgl.

Abbildung 13).

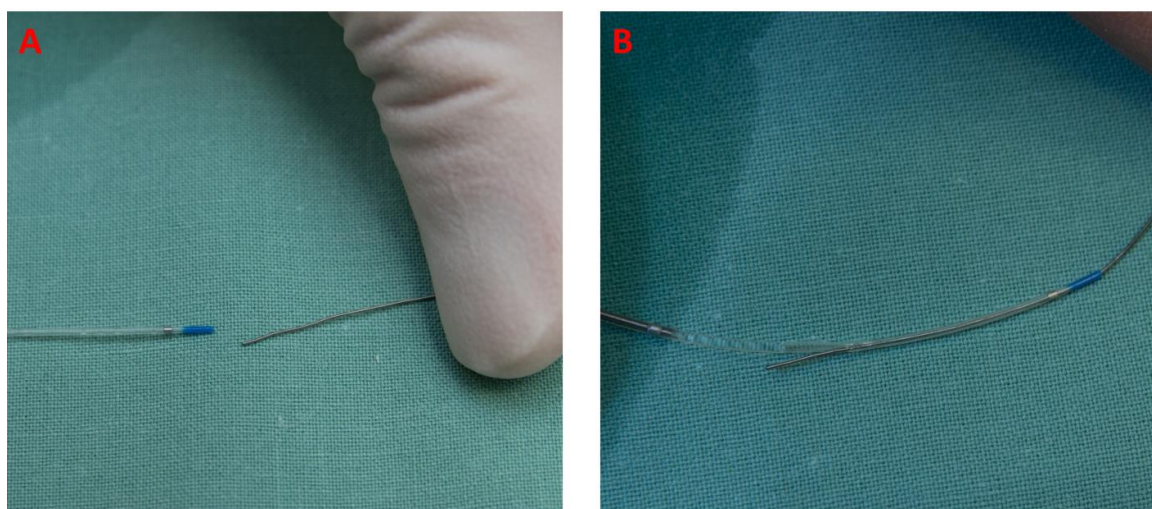


Abbildung 13: Vorbereitung des OCT-Katheters

Der OCT-Katheter (links im Bild) muss auf den Führungsdraht (rechts im Bild) (13A) aufgefädelt werden und kann dann entlang dieser Führungsschiene vorgeschoben werden (13B).

Nun wurde der Katheter mit der OCT-Konsole verbunden und eine Kalibrierung der OCT-Sonde durchgeführt, bevor diese über den Führungsdraht in die Aortenschleuse eingebracht wurde. Entlang des Führungsdrahts wurde der Katheter unter Röntgenkontrolle bis distal des Stentbereichs vorgeschoben. Bevor das Imaging durch Rückzug des Katheters durchgeführt wurde, erfolgte eine erneute Kontrolle der Katheter-Kalibrierung und der Blutfreiheit.

Der Rückzug des OCT-Katheters erfolgte vollautomatisch mit einer Geschwindigkeit von 20 mm/s (180 frames/s). Zeitgleich erfolgte eine ebenfalls automatische Spülung mit Kontrastmittel über einen Power Injector (Medrad® Mark V ProVis® Angiographic system, Medrad®, Inc., One Medrad Drive Indianola, USA). Das Kontrastmittel wurde unverdünnt in einer Rate von 3 ml/s über 4 s (12 ml Gesamtvolumen; Druck 400 psi) über die Gefäßschleuse in die Aorta abdominalis appliziert.

Es erfolgte eine Kontrolle der aufgezeichneten Studie an der OCT-Konsole. Bei Bedarf konnte die OCT-Studie direkt wiederholt werden. War die Aufzeichnung zufriedenstellend, wurde nach gleicher Vorgehensweise auch der zweite Stentbereich gescannt. Nach Abschluss beider OCT-Untersuchungen konnte der Katheter entfernt werden.

2.12 Probenentnahme post-mortem

Vor der Entnahme der Gefäße für die Histologie erfolgte nach Abschluss der OCT-Untersuchungen eine in-situ Fixation des Gefäßsystems. Diese sollte ein übermäßiges Zusammenschrumpfen der Gefäße post-mortem verhindern. Es wurde circa ein Liter Formalin 10% (Formaldehyd-Lösung 10,0%, neutral gepuffert, mit Methanol Stabilisiert, Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken) über die Aortenschleuse, analog einer Dauertropfinfusion appliziert und die ausgespülte Flüssigkeit über die venöse Schleuse in einem dicht schließenden Behälter wieder aufgefangen. Die Fixierung fand außerdem in einem gut belüfteten Raum statt, sodass der Arbeitsschutz gewahrt war.

Nach Abschluss der Fixation erfolgte die vorsichtige Entnahme der Iliakalarterien unter einem Abzug. Dazu wurde zunächst der Bauchschnitt erweitert, die Haut abpräpariert und die Muskulatur der Bauchwand über Entlastungsschnitte aufgeklappt. Nun wurde das Rektum vom Mesenterium gelöst und in einem gut zugänglichen Bereich doppelt abgebunden. Nach dem Absetzen wurden die Gedärme aus der Bauchhöhle herausgelagert. Das kaudale Endstück des

Rektums sowie die Blase wurden mit einer Klemme gefasst, aus der Beckenhöhle gezogen und fixiert. Jetzt konnte das Gefäßsystem im Bereich der Aortenbifurkation vorsichtig freipräpariert werden, wobei insbesondere die völlige Schonung des gestenteten Bereichs entscheidend war. Bevor LIA und RIA abgesetzt wurden, erfolgte je eine Markierung im proximalen Bereich unmittelbar kaudal der bifurcatio aortae. Dafür wurden zwei unterschiedlich gefärbte Fäden verwendet, sodass die eindeutige Identifizierung von rechter und linker Iliakalarterie, sowie deren jeweiligem proximalen Ende jederzeit möglich war (siehe **Abbildung 14**).



Abbildung 14: Gefäßpräparation nach Perfusionsfixation mit Formalin

Blick in die Beckenhöhle, Eingeweide und Harnblase sind herausgelagert, perivaskuläres Fettgewebe wurde bereits abpräpariert. Der Durchtritt der Arterie durch die Bauchwand ist noch intakt (14A). Gefäßsystem mit Bifurkation, Iliakal- und Femoralarterien im vollständig freipräparierten Zustand (14B). Entnommenes Präparat (14C). Die LIA ist bereits proximal mit Ligatur markiert, der implantierte DES schimmert metallisch durch die Gefäßwand. Anschließend wurde auch die RIA markiert, bevor beide iliacae abgesetzt wurden.

Die Gefäße wurden bis zur anschließenden Verarbeitung in Formalin 3,7% (Formaldehyd-Lösung 3,53,7%, neutral gepuffert, mit Methanol stabilisiert, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken) gelagert.

2.13 Probenaufbereitung

Die weitere Probenaufbereitung erfolgte durch die LLS ROWIAK LaserLabSolutions GmbH, Hannover. Die gestenteten Gefäße wurden zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Methylmethacrylat, einem Plastik, eingebettet. Nach Aushärtung des Polymers wurde das Gefäß mit einer Diamantsäge (Bühler Isomet 1000) in gleich große Teile zersägt. Es wurden sieben Blöckchen erstellt: zwei jeweils proximal und distal des Stents im ungestenteten Gewebe (proxex und distex), sowie fünf In-Stent-Schnitte von proximal nach distal durch den Stentbereich (prox, proxmid, mid, distmid und dist) (vgl. **Abbildung 15**). Die MMA-Blöckchen wurden mit einem Spezialkleber (Klaus Lengwenus Spezialkleber, Saarbrücken) auf Glasobjektträger aufgeklebt. Mittels Lasermikrotom (TissueSurgeon, LLS Rowiak LaserLabSolutions GmbH, Hannover) wurden nun histologische Schnitte mit einer Dicke von circa 10 µm angefertigt. Von jedem Blöckchen wurden je zwei Schnitte erstellt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Verhoeff-Van-Gieson (VVG) gefärbt.

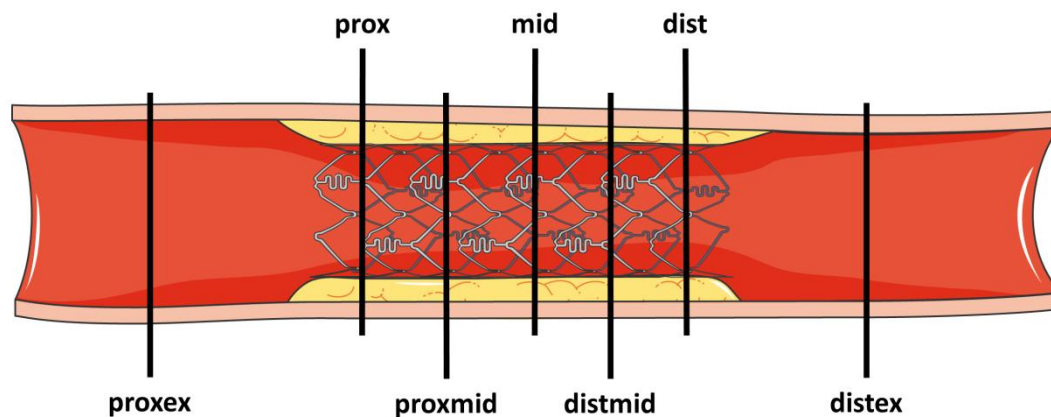


Abbildung 15: Überblick über die Positionen der histologischen Querschnitte

2.14 Analyse der OCT-Untersuchungen

Die OCT-Aufnahmen wurden einerseits einer morphometrischen Analyse unterzogen, andererseits wurde anhand eines eigens für die OCT entwickelten semi-quantitativen Scores das Ausmaß der Neoatherosklerose beurteilt.

2.14.1 Morphometrie in den OCT-pullbacks

Die Morphometrie-Auswertung der OCT *pullbacks* erfolgte mit der QIvus® Software (QIvus Research Edition 3.0.26.0, Medis medical imaging systems bv., Leiden, Niederlande). Zunächst wurde der Stentbereich festgelegt. Danach konnten die eigentlichen Messungen durchgeführt werden. Lumen- und Stent-Kontur konnten von der Software automatisch erfasst werden, teilweise waren jedoch manuelle Korrekturen nötig. Außerdem errechnete die Software den Abstand zwischen jeder Stentstrebe und dem Lumen, d. h. die Dicke der Neointima. Jeder fünfte *frame* (+/- 2 *frames* bei Bedarf) wurde für die Analyse herangezogen.

2.14.2 Neoatherosklerose-Score in den OCT-pullbacks

Das Ausmaß der Neoatherosklerose wurde an einer LightLab-Konsole im Stentbereich evaluiert. Schaumzelleninfiltration präsentierte sich als hypointensiver Bereich mit dahinterliegender *attenuation* (Schatten).

Score 1: keine Schaumzellen in der Neointima

Score 2: Schaumzellen in weniger als 25% der Zirkumferenz

Score 3: Schaumzellen in 25% der Zirkumferenz

Score 4: Schaumzellen in 25-50% der Zirkumferenz

Score 5: Schaumzellen in 50-75% der Zirkumferenz

Score 6: Schaumzellen in über 75% der Zirkumferenz

2.15 Analyse der histologischen Schnitte

An den histologischen Schnitten wurde ebenfalls sowohl eine morphometrische Auswertung der Stentquerschnitte als auch eine semi-quantitative Beurteilung der Neoatheroskleroseausprägung ebenso wie die Evaluierung verschiedenster weiterer Einheilungsparameter über Score-Systeme durchgeführt.

2.15.1 Morphometrie in den histologischen Schnitten

Für die Bestimmung der Morphometrie im Rahmen der Histologie wurden die VVG-Färbungen verwendet. Da sich mit dieser Färbung elastische Fasern gut darstellen, sind diese Schnitte für die Abgrenzung der verschiedenen Schichten der Gefäßwand besonders geeignet. **Abbildung 1C** (unter 1 Gefäßaufbau) zeigt einen exemplarischen VVG-Schnitt mit Beschriftung der wichtigen Gefäßwandschichten. Zuerst wurde jeder Querschnitt am Mikroskop (BX41TF, Olympus, Tokyo, Japan) mit der angeschlossenen Kamera (DP74, Olympus, Tokyo, Japan) abfotografiert und somit digitalisiert. Anschließend erfolgte die morphometrische Auswertung mittels Cell^F-Software (Version 2.3, Soft Imaging System GmbH, Münster). An jedem Querschnitt aus dem Stentbereich wurden Lumen, IEL und EEL mittels Software ausgemessen. Die Dicke der Neointima, definiert als der Abstand zwischen der Lumenseite jeder Stentstrebe (*strut*) und dem Lumen (Neointimadicke über den *struts*), sowie der Abstand zwischen der Lumenseite der IEL und dem Lumen im Strebenzwischenbereich (Neointimadicke zwischen den *struts*) wurden ermittelt. Aus diesen Werten wurden die Mittelwerte für die Neointimadicke über und zwischen den *struts* errechnet. **Abbildung 16** zeigt exemplarische Morphometrie-Messungen. Anhand der gemessenen Werte erfolgte dann eine Berechnung weiterer morphometrischer Parameter mittels folgender Formeln:

$$\text{Media} = \text{EEL} - \text{IEL}$$

$$\text{Neointima} = \text{IEL} - \text{Lumen}$$

$$\% \text{ Stenose} = [1 - (\text{Lumen}/\text{IEL})] * 100$$

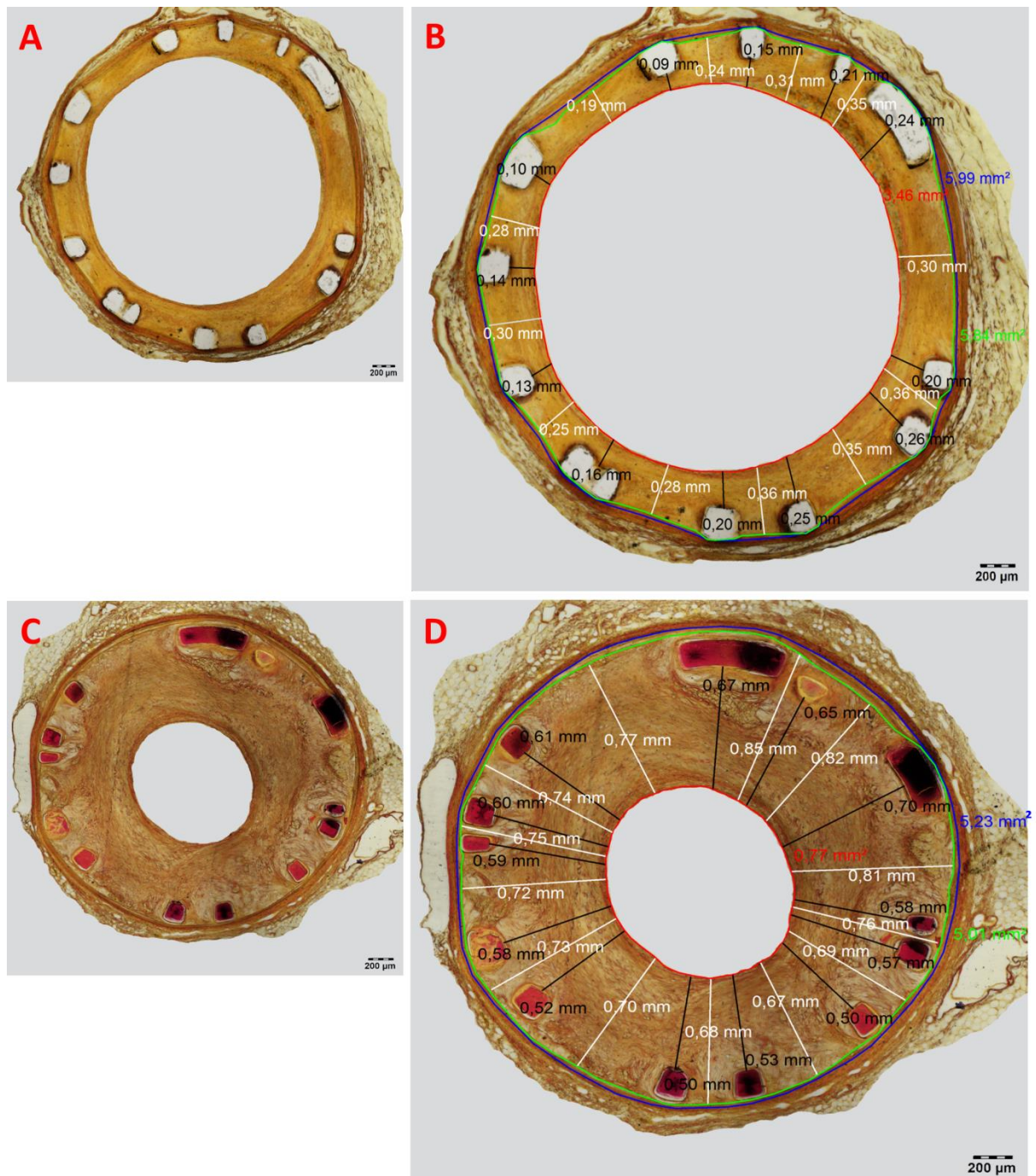


Abbildung 16: VVG-gefärbte Gefäßquerschnitte ohne und mit Morphometrie-Messungen

Gezeigt sind je ein Querschnitt aus einem DES (16A) und aus einem BRS (16C), sowie die daran vorgenommenen morphometrischen Messungen (16B und 16D). Blau = EEL, grün = IEL, rot = Lumen, schwarz = Neointima über den *struts*, weiß = Neointima zwischen den *struts*.

2.15.2 Semi-quantitative Auswertung der histologischen Schnitte

Unter dem Mikroskop erfolgte bei 200- bis 400-facher Vergrößerung anschließend die Evaluierung von Gefäßwandverletzungen und Einheilung. Dazu wurden die im Folgenden

detailliert aufgeführten Score-Systeme verwendet. Außerdem wurde die prozentuale Anzahl an Stentstreben mit Einblutung, mehrkernigen Riesenzellen und Kalzifikation mit der folgenden Formel bestimmt: z. B. % Riesenzellen = (Zahl der *struts* mit Riesenzellen/Zahl der *struts* im Querschnitt) x 100). Zuletzt erfolgte eine Evaluierung der Re-Endothelialisation des Stents, welche als % der Zirkumferenz angegeben wurde. Während der Verletzungs-Score im VVG-Schnitt ermittelt wurde, wurden alle weiteren Parameter im HE-Schnitt beurteilt.

Verletzungs-Score¹⁵⁰:

Der *Injury Score* wurde *strut*-basiert ermittelt und der Mittelwert pro Querschnitt angegeben. Er umfasste Abstufungen von 0 bis 3:

Score 0: IEL intakt, Media komprimiert, aber nicht beschädigt

Score 1: IEL eingerissen, Media komprimiert

Score 2: IEL eingerissen, Media sichtbar eingerissen, EEL komprimiert, aber intakt

Score 3: IEL eingerissen, Media großflächig bis in die EEL hinein eingerissen, *struts* teils in Adventitia

Entzündungs-Score¹⁵¹:

Der *Inflammation Score* wurde als Mittelwert pro Querschnitt angegeben.

Die Bewertung erfolgte in den Abstufungen 0 bis 4:

Score 0: < 25% *struts* mit weniger als 10 Entzündungszellen

Score 1: bis 25% *struts* mit mehr als 10 Entzündungszellen

Score 2: 25-50% *struts* mit mehr als 10 Entzündungszellen

Score 3: > 50% *struts* mit mehr als 10 Entzündungszellen

Score 4: 2 oder mehr *struts* mit granulomatöser Entzündungsreaktion

Einblutungen:

Der Prozentsatz an *struts*, der von Einblutung umgeben war, wurde pro Schnitt angegeben (% *struts* mit Hämorrhagie).

Vielkernige Riesenzellen:

Pro Querschnitt wurde die Prozentzahl der *struts*, die von vielkernigen Riesenzellen umgeben waren, angegeben (% *struts* mit vielkernigen Riesenzellen).

Kalzifizierung:

Pro Schnitt wurde die Prozentzahl der Streben, die Kalzifikationen aufwiesen, ermittelt (% *struts* mit Kalzifizierung).

Endothelialisation:

In jedem Querschnitt wurde der Prozentsatz der Lumenoberfläche, die wieder von Endothel bedeckt war, angegeben (% endothelialisiert).

2.15.3 Neoatherosklerose-Score in den histologischen Schnitten

Zur Beurteilung der Neoatherosklerose wurde ein zusätzliches Score-System angewandt, welches im Rahmen von Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe von Kristina Euller entwickelt und geprüft wurde.

Neoatherosklerose-Score (nach Kristina Euller):

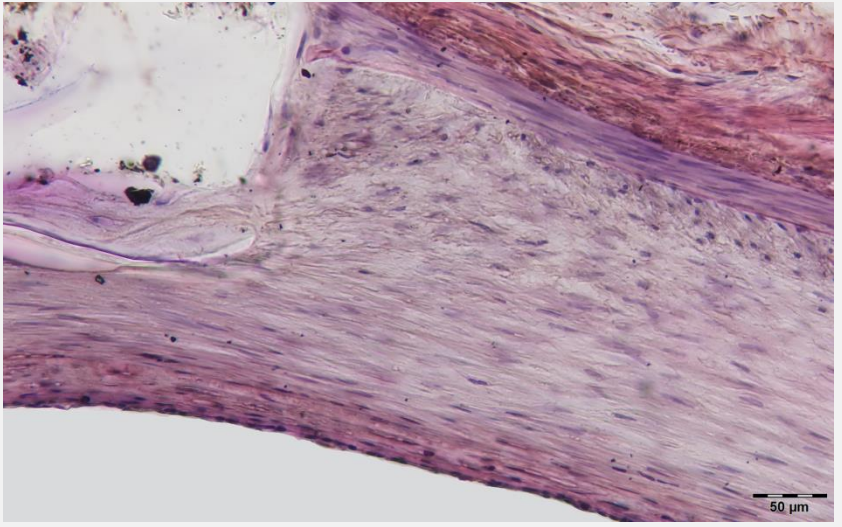
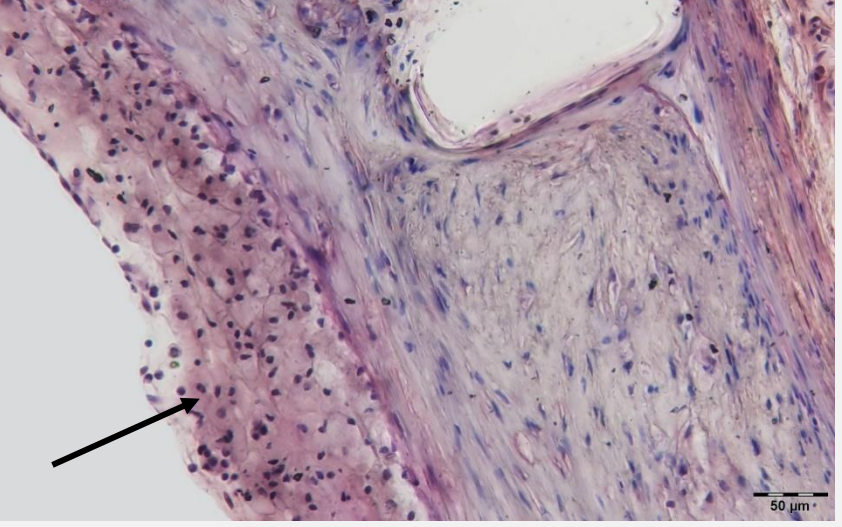
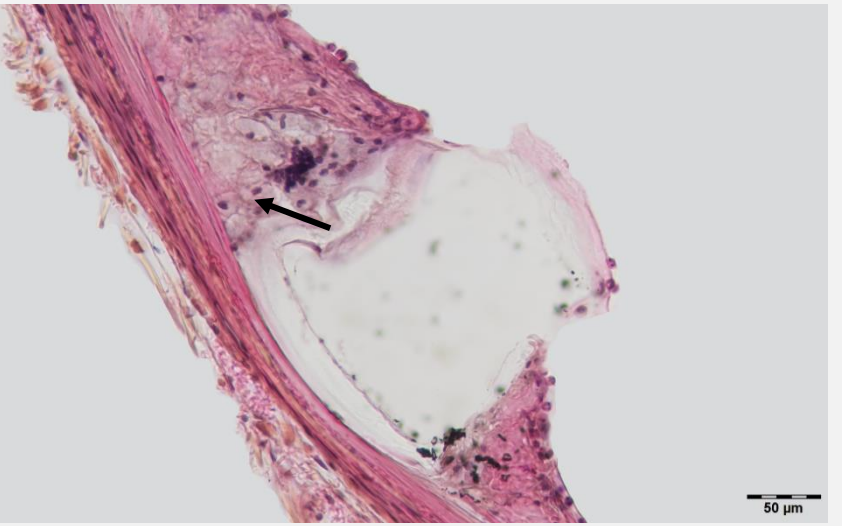
Es wurden die Einwanderung und Lokalisation der Schaumzellen beurteilt und dafür ein Score von 1 bis 4 vergeben. Das Scoring erfolgte dabei pro Quadrant des Querschnitts, die resultierenden vier Scores pro histologischem Schnitt wurden anschließend zu einem Mittelwert pro Querschnitt zusammengefasst. **Tabelle 3** zeigt beispielhafte Bilder für jeden Score.

Score 1: keine Schaumzellen in der Neointima

Score 2: Quadrant mit Schaumzellen in den oberflächlichen Schichten der Neointima

Score 3: Quadrant mit Schaumzellen in den tiefen Schichten der Neointima

Score 4: Quadrant mit Schaumzellen in den oberflächlichen und tiefen Schichten der Neointima

Score	Beschreibung	Beispielbild
Score 1	keine Schaumzellen in der Neointima	
Score 2	Quadrant mit Schaumzellen in den oberflächlichen Schichten der Neointima	
Score 3	Quadrant mit Schaumzellen in den tiefen Schichten der Neointima	

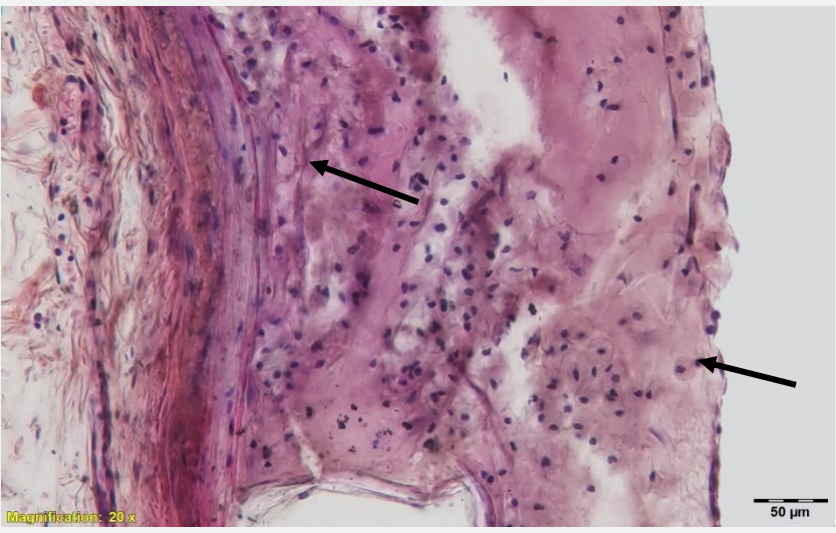
Score 4	Quadrant mit Schaumzellen in den oberflächlichen und tiefen Schichten der Neointima	
----------------	---	--

Tabelle 3: Histologie-Neoatherosklerose-Score

Der Neoatherosklerose-Score in der Histologie mit Beispielbildern für jeden Score. Pfeile weisen auf Schaumzellinfiltrate hin.

2.16 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Grafiken wurde mittels JMP Pro (Version 12.0, Cary, NC) und SPSS (IBM, Version 22, Armonk, NY) durchgeführt.

Die statistische Verteilung der Datensätze wurde zunächst mittels des Wilk-Shapiro-Tests untersucht. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse aus Gruppe 1 (Euthanasie nach 91 Tagen, vor Randomisierung zu Statin und Placebo) wurden normal verteilte Daten mittels ANOVA verglichen. Ein Wilcoxon Kruskal-Wallis rank sums Test wurde herangezogen, um das Signifikanzniveau für nicht normal verteilte Daten zu ermitteln. Bei den Ergebnissen der Gruppe 1 wurden Mittelwerte und Standardabweichung (SD) angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den Übersichtstabellen mittels Stern (*) hervorgehoben.

Um die Resultate aus Gruppe 2 und 3 auszuwerten, wurden komplexere Modelle benötigt. Aufgrund der gleichzeitig einfließenden Therapieoptionen (BRS vs. DES und Statine vs. Placebo) sowie des Clusterings von Datensätzen wurde zur Analyse von normal verteilten Daten ein lineares GEE-Modell (*Generalized Estimating Equations*, deutsch: verallgemeinerte Schätzgleichungen) angewandt. Nicht normal verteilte Daten wurden im GEE-Modell mittels gamma-Verteilung mit log-Verknüpfungsfunktion analysiert. Zusätzlich wurde das p of

interaction (deutsch: p-Wert der Interaktion) bestimmt, welches angibt, inwiefern die Effekte von lokaler (BRS vs. DES) und systemischer (Statin vs. Placebo) Therapie voneinander abhängig sind. Ergebnisse aus den Gruppen 2 und 3 wurden als geschätzte Mittelwerte mit 95%igem Konfidenzintervall (CI) angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet und in den Übersichtstabellen mittels Stern (*) hervorgehoben.

V ERGEBNISSE

1 Gewichtsentwicklung

Bei allen Tieren wurde über den Versuchszeitraum eine Zunahme des Körpergewichts beobachtet. **Abbildung 17** zeigt exemplarisch den Verlauf des Körpergewichts von Kaninchen 4. Zu beachten sind die Einbrüche des Körpergewichts post-OP nach OP1 und OP2. Durch Zufütterung der Tiere mit Critical Care-Brei (Critical Care, Oxbow Animal Health, Omaha, USA) wurde versucht, der Gewichtsreduktion entgegenzuwirken und den Appetit der Kaninchen post-OP wieder anzuregen.

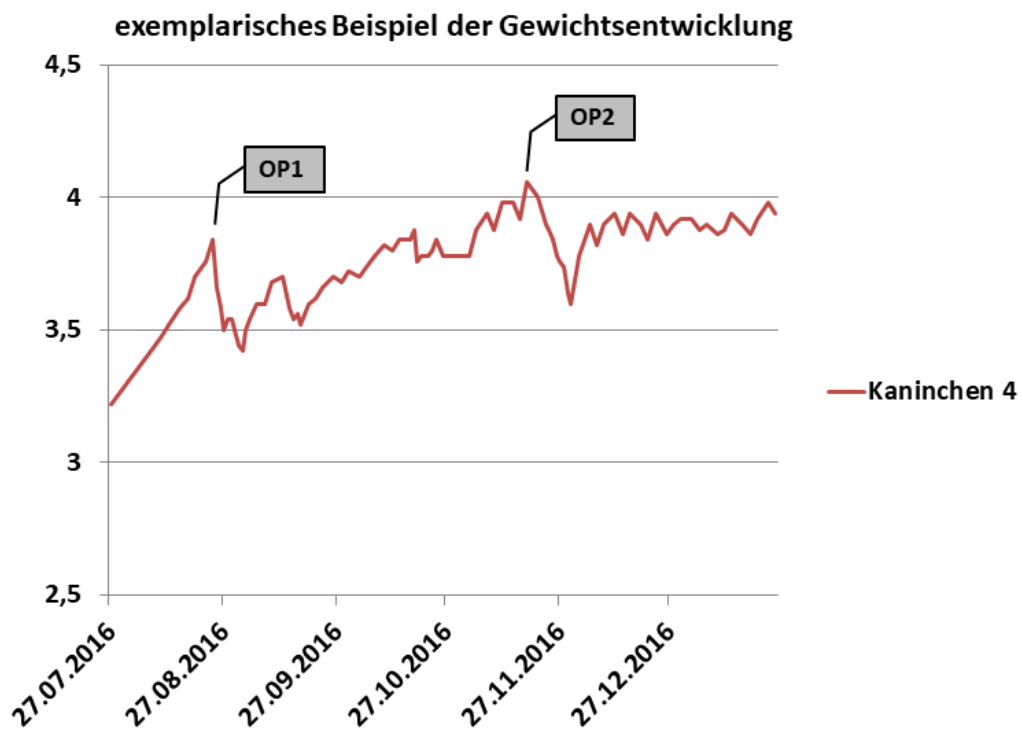


Abbildung 17: Entwicklung des Kaninchengewichts über den Versuchszeitraum

2 Blutuntersuchungen und Gruppeneinteilung

Anhang 8 zeigt die detaillierte Übersicht aller Ergebnisse der Blutuntersuchungen an Tag -1, Tag 7, Tag 35, Tag 63, Tag 91, sowie Tag 126 und Tag 161 bei Tieren der Gruppe 2 und 3.

Auf die Cholesterin-Blutwerte soll aufgrund der Relevanz für den durchgeführten Versuch noch näher eingegangen werden.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch den Verlauf des Serumcholesterinspiegels über den Versuchszeitraum. Zu beachten sind der schnelle Anstieg des Cholesterinspiegels zwischen Tag 0 (Fütterungsstart) und Tag 7 (OP1), gefolgt von einem weiteren, etwas flacheren Anstieg auf den maximalen Serumwerten an Tag 35 (Futterumstellung von 1% auf 0,025% Cholesterin). Infolge der Futterumstellung sinkt der Serumcholesterinspiegel bis zur Blutuntersuchung an Tag 63 deutlich ab, stabilisiert sich jedoch bis Tag 91 wieder. Der an Tag 101 durchgeführte Wechsel auf Normaldiät (siehe V, 4 Atorvastatin-Therapie) resultierte in einem erneuten Absinken des Wertes. An Tag 161 liegt der Serumcholesterinspiegel jedoch bei über der Hälfte der Tiere (11 aus 21) immer noch über dem Referenzbereich, der von Hein und Hartmann zwischen 0,31 und 2,66 mmol/l (dies entspricht 5,59 bis 47,93 mg/dl) angegeben wird¹⁵². Vor Fütterungsstart an Tag -1 lag bei 85% der Tiere der Cholesterinspiegel innerhalb dieses Referenzbereichs.

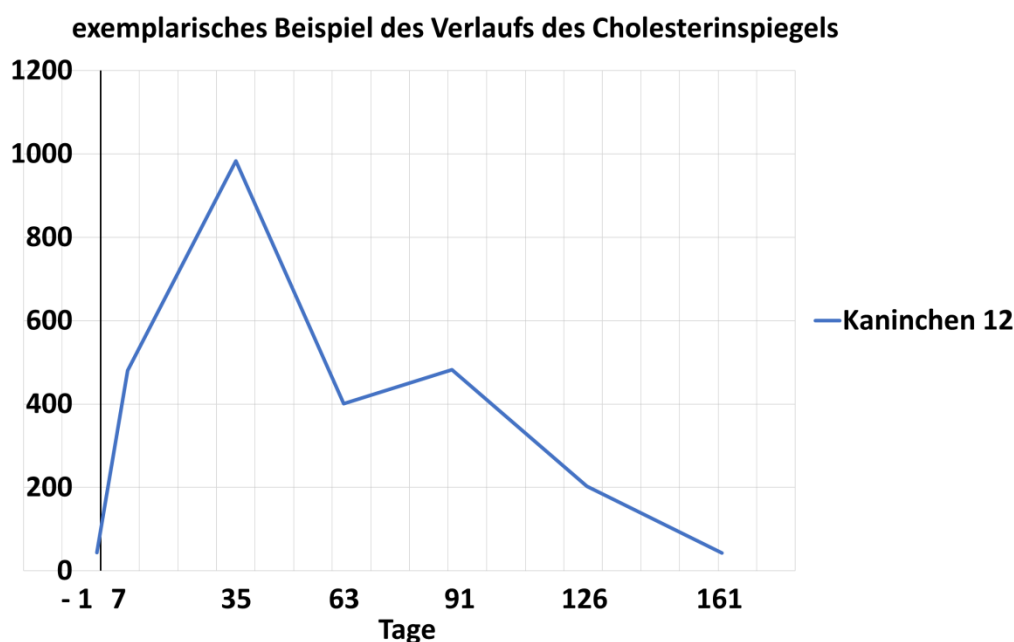


Abbildung 18: Verlauf des Serumcholesterinspiegels über den Versuchszeitraum

Die Blutuntersuchung an Tag 35 erfolgte zur Untersuchung auf sog. „Non-Responder“. Da zu diesem Zeitpunkt bei allen Tieren ein Cholesterinwert über dem Schwellenwert von 500 mg/dl erreicht wurde, konnten alle Kaninchen als „Responder“ im Versuch verbleiben. Das aus der Differenz zwischen dem Serumcholesterinwert an Tag 35 und Tag 7 errechnete Delta (Δ) diente

der Gruppeneinteilung. Tiere mit ähnlichen Δ -Cholesterinwerten wurden in Dreiergruppen zusammengefasst. Aus diesen Dreiergruppen erfolgte die randomisierte Zuteilung auf Gruppe 1, 2 oder 3. Wie unter Punkt 3 Ausfälle genauer dargestellt, wurden alle nachträglich in den Versuch gestarteten Ersatztiere automatisch und unabhängig von ihren Δ -Cholesterinwerten Gruppe 1 zugeteilt.

In **Abbildung 19** werden die erreichten Serumcholesterinwerte jeder Gruppe als sog. *Area Under the Curve* (AUC) (deutsch: Fläche unter der Kurve) dargestellt. Gruppe 1 erreichte einen Wert von 6864,87 mg/dl, Gruppe 2 8995,91 mg/dl und Gruppe 3 9617,43 mg/dl.

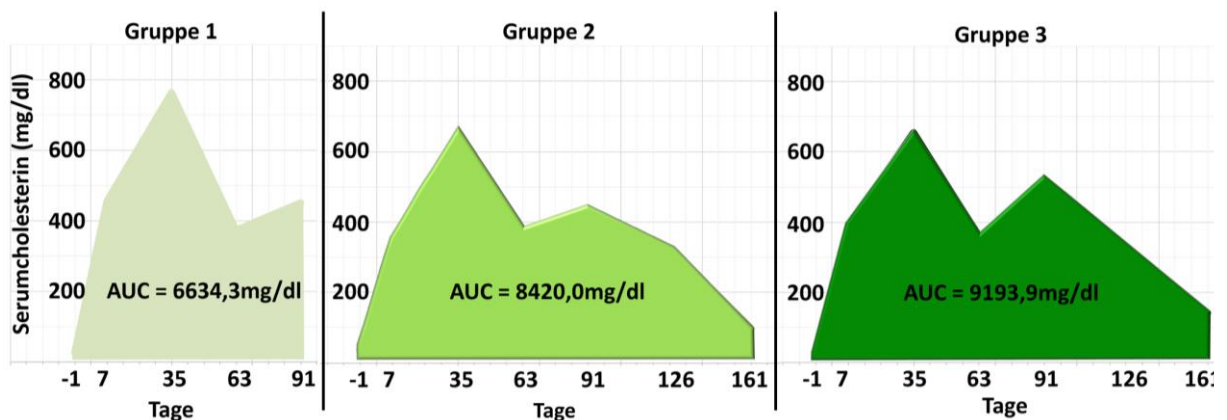


Abbildung 19: Serumcholesterinspiegel der drei Versuchsgruppen dargestellt als AUC

3 Ausfälle

Bei der Durchführung des neoatherosklerotischen Tiermodells waren Ausfälle von Kaninchen zu verzeichnen.

Drei Tiere entwickelten post-OP neurologische Symptome mit Opisthotonus und Krämpfen und wurden euthanasiert. Diese Symptome können auf die Ligatur der Carotiden zurückgeführt werden. Bei den meisten Kaninchen besteht eine ausreichende Versorgung des Gehirns über Kollateralgefäße. Sind diese jedoch schlecht ausgeprägt, kommt es im Zuge der Carotis-Ligatur zu einer Minderperfusion mit Schädigung des Gehirns, welche sich in neurologischen Symptomen äußert.

Bei drei weiteren Kaninchen kam es bereits im Rahmen der OP zu Zwischenfällen: ein Tier verstarb aufgrund eines Narkosezwischenfalls, bei einem Kaninchen riss die A.carotis bei Ligatur und bei einem dritten Tier kam es im Rahmen der Denudation bei OP2 zu einer Dissektion der A.iliaca. Die Tiere konnten trotz intensiver sofort eingeleiteter Therapie nicht gerettet werden.

Perakuter Tod, vermutlich aufgrund eines thrombotischen Geschehens (trotz antikoagulativen Regimes mit Aspirin und Heparin intra-OP und anschließender täglicher Aspirin-Gabe post-OP), war bei einem weiteren Kaninchen todesursächlich. Ein Tier entwickelte Leberversagen und wurde mit Ikterus euthanasiert.

Drei weitere Tiere mussten nachträglich ausgeschlossen werden. Bei einem davon war ein Stent in die bifurcatio aortae disloziert. Bei den beiden anderen Kaninchen wurden vollständige Verschlüsse des Gefäßlumens durch Stentthrombosen, eine im BRS und eine im DES, festgestellt.

Um zeitliche Verzögerungen des Tierversuchs durch den Ausfall von Tieren und den Einsatz von Reservetieren gering zu halten, wurden alle verwendeten Reservetiere in Gruppe 1 eingeteilt. Dadurch betrug ihre Versuchsdauer nur 91 und nicht 161 Tage. Diese Einteilung erfolgte unabhängig vom Serumcholesterinspiegel zwischen Tag 7 und 35 nicht-randomisiert.

Für die Analysen standen in Gruppe 1 n = 9 Tiere zur Verfügung, sowie jeweils n = 10 Kaninchen in Gruppe 2 und 3.

4 Atorvastatin-Therapie

Da alle 11 Tiere der Statin-Gruppe innerhalb weniger Tage nach Therapiebeginn mit Atorvastatin 3 mg/kg/Tag unterschiedlich stark ausgeprägten Ikterus als Anzeichen eines Leberversagen entwickelten und durch Dosisreduktion auf 1,5 mg/kg/Tag keine Besserung der Symptome eintrat, wurde bei allen Kaninchen die Medikamenten- bzw. Placebogabe nach 10 Tagen (Tag 100) abgebrochen. Zusätzlich musste die Cholesterindiät auf eine normale Pelletdiät umgestellt werden. Im Zuge dieser Maßnahmen besserten sich bei allen Tieren in Gruppe 2 innerhalb einiger Tage die Symptome.

Die von Tier zu Tier unterschiedlich ausgeprägte Reaktion auf die Cholesterinfütterung wurde auch daran deutlich, dass drei Kaninchen auch ohne Statin-Therapie (ein Kaninchen aus Gruppe 1, zwei Tiere aus Gruppe 3) zu unterschiedlichen Zeitpunkten Anzeichen eines Leberversagens mit Anorexie und Ikterus entwickelten. Bei allen Kaninchen war im Rahmen der Euthanasie die Schädigung der Leber mit Hepatomegalie und teilweise auch Gallenstauung offensichtlich.

5 „baseline“-Werte der Gruppe 1

Kaninchen in Gruppe 1 (n = 9) wurden nach 91 Tagen euthanasiert. Die Gefäße wurden mittels OCT untersucht und anschließend für die histopathologische Evaluation aufbereitet und ausgewertet. Ergebnisse der Gruppe 1 fungierten als *Baseline*-Werte vor der Randomisierung der verbleibenden Tiere zu Statin-Therapie oder Placebo. Die Daten wurden ausgewertet, in dem die Ergebnisse aus BRS und DES mittels ANOVA verglichen wurden. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichung.

5.1 Untersuchung der OCT-pullbacks

Alle OCT-Untersuchungen wurden morphometrisch ausgewertet. Separat erfolgte eine Beurteilung der Schaumzellinfiltration mittels Neoatherosklerose-Score.

5.1.1 Morphometrie in den OCT-pullbacks

Tabelle 4 gibt die Ergebnisse der morphometrischen Messungen und Berechnungen der Gruppe 1 wieder.

		Lumenfläche [mm²]			Stentfläche [mm²]		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	2,54	0,51	0,0013*	4,51	0,48	0,0017*
	DES (n=9)	3,80	0,50		5,69	0,51	
		Neointimafläche [mm²]			Neointima-Dicke über den struts [mm]		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	1,86	0,58	0,0193*	0,33	0,10	0,0041*
	DES (n=9)	1,09	0,64		0,16	0,08	
		% Stenose					
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert			
lokal	BRS (n=9)	43,27	14,10	0,0031*			
	DES (n=9)	18,94	10,81				

Tabelle 4: Morphometrie-Ergebnisse ermittelt in den OCT-pullbacks nach 91 Tagen

Bereits nach 91 Tagen zeigten sich bei allen evaluierten Parametern signifikante Unterschiede zwischen den Arterien, die mit einem BRS und denen, die mit einem DES behandelt worden waren. Im BRS betrug die gemessene durchschnittliche Dicke der Neointima über den Stentstreben 0,33 mm (SD = 0,10 mm), im DES 0,16 mm (SD = 0,08 mm) ($p = 0,0041$). Auch die errechnete Neointimafläche zeigte eine deutlich ausgeprägtere Proliferation der Neointima im BRS (1,86 mm² vs. 1,09 mm²; SD = 0,58 mm² bzw. 0,64 mm²; $p = 0,0193$). Dies resultiert in einem höheren Wert bei der Stenose: 43,27% im BRS vs. 18,94% im DES (SD = 14,10% bzw. 10,81%; $p = 0,0031$).

5.1.2 OCT-Neoatherosklerose-Score in den OCT-pullbacks

Die über den Stentstreben neu gebildete Neointima stellte sich in der OCT-Untersuchung zumeist als homogenes, signalintensives Band dar. Auch nach 91 Tagen ließen sich jedoch bereits Schaumzellinfiltrationen feststellen und bestätigten damit den Erfolg des neoatherosklerotischen Tiermodells. Der resultierende Neoatherosklerose-Score zeigte eine Tendenz zu einer niedrigeren neoatherosklerotischen Belastung im BRS, jedoch ist der Unterschied nach 91 Tagen nicht signifikant (vgl. **Tabelle 5**).

		Neoatherosklerose-Score		
		Mittelwert	Std.-Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	1,13	0,18	0,0695
	DES (n=9)	1,32	0,32	

Tabelle 5: Ergebnisse des OCT-Neoatherosklerose-Scores nach 91 Tagen

5.2 Untersuchung der histologischen Schnitte

Die histologischen Schnitte wurden morphometrisch und semi-quantitativ beurteilt. Auch in der Histologie kam zusätzlich ein eigener Neoatherosklerose-Score zum Einsatz.

5.2.1 Morphometrie in den histologischen Schnitten

Die Resultate der morphometrischen Auswertung mittels Histopathologie spiegelten das Ergebnis der OCT-Evaluierung wider. Insgesamt wiesen die mittels DES behandelten Arterien einen größeren Gefäßquerschnitt auf. Die EEL- und IEL-Flächen im DES waren größer als im BRS (EEL-Fläche: 5,58 mm² im BRS vs. 6,44 mm² im DES; SD = 0,58 mm² bzw. 0,55 mm²; p = 0,0054, IEL-Fläche: 5,26 mm² vs. 6,26 mm²; SD = 0,56 mm² bzw. 0,53 mm²; p = 0,0013). Gleichzeitig zeigte sich im BRS eine ausgeprägtere Neointimaprolieration (Neointimafläche: 3,01 mm² im BRS vs. 1,89 mm² im DES; SD = 0,59 mm² bzw. 0,76 mm²; p = 0,0030). So waren im DES nach 91 Tagen noch über 33% (SD = 27,88%) der Stentstreben nicht von Neointima gegen den Blutstrom abgeschildert, während im BRS weniger als 0,8% (SD = 1,59%) der Streben freilagen (p = 0,0200). Bei der Beurteilung der Stenose wies der BRS eine signifikant größere prozentuale Stenose auf

als der DES (58,21% vs. 30,07%; SD = 11,25% bzw. 10,63%; $p = 0,0007$). **Tabelle 6** fasst die Ergebnisse der Morphometrie in der Histologie zusammen.

		EEL-Fläche [mm²]			IEL-Fläche [mm²]		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	5,58	0,58	0,0054*	5,26	0,56	0,0013*
	DES (n=9)	6,44	0,55		6,26	0,53	
		Mediafläche [mm²]			Neointimafläche [mm²]		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	0,32	0,08	0,0005*	3,01	0,59	0,0030*
	DES (n=9)	0,18	0,04		1,89	0,76	
		Neointima-Dicke über den <i>struts</i> [mm]			Neointima-Dicke zwischen den <i>struts</i> [mm]		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	0,30	0,09	0,0031*	0,48	0,10	0,0009*
	DES (n=9)	0,12	0,10		0,21	0,10	
		Lumen-Fläche [mm²]			% Stenose		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	2,24	0,72	0,0003*	58,21	11,25	0,0007*
	DES (n=9)	4,37	0,70		30,07	10,63	
		% frei liegende <i>struts</i>					
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert			
lokal	BRS (n=9)	0,77	1,59	0,0200*			
	DES (n=9)	33,64	27,88				

Tabelle 6: Histologie-Morphometrie-Ergebnisse nach 91 Tagen

5.2.2 Semi-quantitative Auswertung der histologischen Schnitte

Neben den morphometrischen Messungen und Berechnungen erfolgte in der Histologie auch eine semi-quantitative Beurteilung weiterer Parameter. Einerseits wurden die beurteilten

Werte anhand von Score-Systemen erfasst, andererseits wurden weitere Faktoren in Prozent der betroffenen *struts* aus der Gesamtheit der *struts* pro Querschnitt angegeben.

Bei der Beurteilung von Einblutung in neointimales Gewebe wies ein höherer Prozentsatz der BRS-Streben Hämorrhagien auf (10,94% vs. 3,64%; SD = 9,03% bzw. 4,38%; $p = 0,0674$). Ergebnisse aus der Beurteilung der Gefäßwandverletzungen zeigten ähnliche Werte für BRS und DES (Verletzungs-Score: 0,41 vs. 0,48; SD = 0,27 bzw. 0,27; $p = 0,5660$). Die Evaluierung der entzündlichen Gewebereaktion zeigte insgesamt eine ausgeprägtere, jedoch nicht-signifikant stärkere Infiltration von Entzündungszellen im BRS (Entzündungs-Score: 1,84 vs. 1,31; SD = 0,76 bzw. 0,49; $p = 0,1092$). Bei der speziellen Untersuchung auf mehrkernige Riesenzellen fanden sich in der Umgebung von BRS-Streben nach 91 Tagen signifikant mehr *struts* die von diesen Zellen umgeben waren (8,25% vs. 2,91%; SD = 3,29% bzw. 1,61%; $p = 0,0009$). In **Tabelle 7** werden die Ergebnisse aller erhobenen Parameter aufgeführt.

		% Einblutung			% mehrkernige Riesenzellen		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	10,94	9,03	0,0674	8,25	3,29	0,0009*
	DES (n=9)	3,64	4,38		2,91	1,61	
		% Endothelialisierung			% Kalzifizierung		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	40,00	21,23	0,3099	73,10	23,80	0,7572
	DES (n=9)	30,52	21,93		72,52	18,51	
		Entzündungs-Score			Verletzungs-Score		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert	Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	1,84	0,76	0,1092	0,41	0,27	0,5660
	DES (n=9)	1,31	0,49		0,48	0,27	

Tabelle 7: Semi-quantitative Auswertung in der Histologie nach 91 Tagen

5.2.3 Neoatherosklerose-Score in den histologischen Schnitten

Auch die Beurteilung der Neointima auf Schaumzellinfiltration mittels Histologie-Neoatherosklerose-Score konnte bereits nach 91 Tagen frühe neoatherosklerotische Veränderungen nachweisen. Die in der OCT-Untersuchung bereits erkennbare Tendenz zu einer im BRS weniger stark ausgeprägten Neoatherosklerose war hier noch deutlicher erkennbar. Ein im BRS resultierender Score von 1,18 (SD = 0,08) im Vergleich zu einem Score von 1,43 (SD = 0,22) im DES stellte eine signifikant geringere Neoatherosklerose-Belastung im BRS nach 91 Tagen dar ($p = 0,0188$) (vgl. **Tabelle 8**).

		Neoatherosklerose-Score		
		Mittelwert	Std.- Abweichung	p-Wert
lokal	BRS (n=9)	1,18	0,08	0,0188*
	DES (n=9)	1,43	0,22	

Tabelle 8: Ergebnisse des Histologie-Neoatherosklerose-Scores nach 91 Tagen

6 Werte der Gruppen 2 und 3

Ergebnisse aus den Gruppen 2 und 3 wurden mittels GEE-Modell ausgewertet, indem einerseits BRS gegen DES verglichen und andererseits der Effekt des Statins im Vergleich zum Placebo ausgewertet wurde. Das p of interaction (deutsch: p -Wert der Interaktion) gab an, inwiefern die Effekte von lokaler (BRS vs. DES) und systemischer (Statin vs. Placebo) Therapie voneinander abhängig sind. In Gruppe 2 wurden $n = 10$ Tiere analysiert. Für Auswertungen in Gruppe 3 konnten ebenfalls $n = 10$ Kaninchen herangezogen werden. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um geschätzte Mittelwerte mit unterem und oberem Konfidenzintervall (CI).

6.1 Untersuchung der OCT-pullbacks

Die OCT-Aufnahmen wurden morphometrisch erfasst und ausgewertet. Zusätzlich wurde der oben aufgeführte Score (siehe 2.14.2) angewandt, um das Ausmaß der Schaumzellinfiltration pro *frame* zu bewerten.

6.1.1 Morphometrie in den OCT-pullbacks

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse der morphometrischen Untersuchungen und macht deutlich, dass die Statin-Therapie keinen Einfluss auf diese Parameter hat.

		Lumenfläche [mm²]				Stentfläche [mm²]			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	2,08	1,81	2,39	0,0001*	4,08	3,75	4,44	0,0001*
	DES (n=20)	4,61	4,41	4,82		5,97	5,82	6,12	
systemisch	Statin (n=10)	3,16	2,89	3,45	0,596	4,99	4,70	5,29	0,660
	Placebo (n=10)	3,04	2,70	3,41		4,88	4,52	5,28	
p of interaction		0,302				0,422			
		Neointimafläche [mm²]				Neointima-Dicke über den struts [mm]			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	1,86	1,63	2,09	0,0001*	0,34	0,30	0,39	0,0001*
	DES (n=20)	1,32	1,12	1,52		0,19	0,16	0,22	
systemisch	Statin (n=10)	1,62	1,33	1,92	0,723	0,26	0,22	0,31	0,639
	Placebo (n=10)	1,56	1,38	1,74		0,25	0,22	0,28	
p of interaction		0,587				0,327			
		% Stenose							
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert				
lokal	BRS (n=20)	47,00	41,44	53,32	0,0001*				
	DES (n=20)	21,77	18,82	25,20					
systemisch	Statin (n=10)	32,31	27,03	38,61	0,857				
	Placebo (n=10)	31,68	28,14	35,67					
p of interaction		0,222							

Tabelle 9: Ergebnisse der morphometrischen Messungen in der OCT nach 161 Tagen

Bereits nach 91 Tagen war die Stentfläche im BRS signifikant kleiner als im DES (vgl. **Tabelle 4**). Nach 161 Tagen ist dieser Unterschied noch ausgeprägter, im BRS beträgt die Stentfläche noch 4,08 mm² (CI: 3,75, 4,44), im DES 5,97 mm² (CI: 5,82, 6,12) (p < 0,0001). Die Fläche der

Neointima im BRS bleibt mit 1,86 mm² (CI: 1,63, 2,09) konstant, während im DES die Neointimafläche auf 1,32 mm² (CI: 1,12, 1,52) ansteigt ($p < 0,0001$). Die prozentuale Stenose nimmt in beiden Stenttypen zu (47,00% im BRS (CI: 41,44, 53,32) vs. 21,77% im DES (CI: 18,82, 25,20); $p < 0,0001$).

6.1.2 OCT-Neoatherosklerose-Score in den OCT-pullbacks

Konnte nach 91 Tagen nur eine Tendenz zu einer geringeren Neoatherosklerose-Belastung der BRS-Neointima in der OCT-Untersuchung festgestellt werden, so zeigte sich nach 161 Tagen ein hoch-signifikant niedrigerer Neoatherosklerose-Score im BRS (1,20 (CI: 1,08, 1,33) vs. 2,09 (CI: 1,83, 2,39); $p < 0,0001$). Bei der Evaluierung der Schaumzellinfiltration zeigte sich in den OCT-pullbacks kein Unterschied zwischen der Statin- und der Placebo-Gruppe (siehe **Abbildung 20**). Alle Ergebnisse des erhobenen OCT-Neoatherosklerose-Scores sind in **Tabelle 10** dargestellt.

		Neoatherosklerose-Score			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	1,20	1,08	1,33	0,0001*
	DES (n=20)	2,09	1,83	2,39	
systemisch	Statin (n=10)	1,57	1,32	1,87	0,873
	Placebo (n=10)	1,60	1,44	1,77	
p of interaction		0,435			

Tabelle 10: Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scorings in der OCT nach 161 Tagen

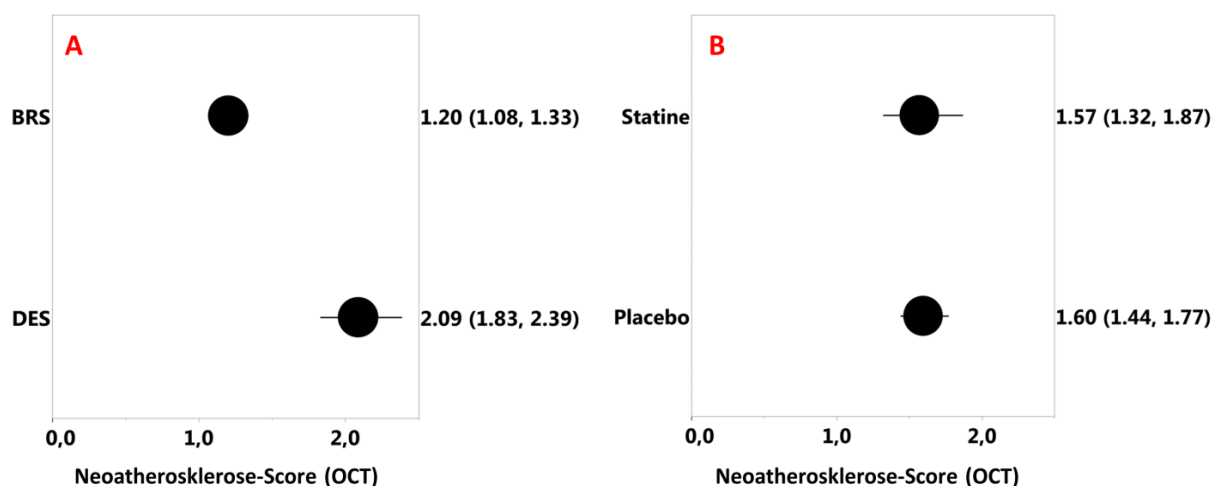


Abbildung 20: Ergebnisse des OCT-Neoatherosklerose-Scores

Die Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scores in den OCT-pullbacks dargestellt als Forest-plot für den Vergleich zwischen BRS und DES (20A) sowie den Vergleich Statin und Placebo (20B). Bei den Werten handelt es sich um geschätzte Mittelwerte mit unterem und oberem CI.

6.2 Untersuchung der histologischen Schnitte

6.2.1 Morphometrie in den histologischen Schnitten

Auch in der Histologie war kein Einfluss der systemischen Therapie auf morphometrische Faktoren erkennbar. Dagegen bestand beim Vergleich der lokalen Therapien bei allen Parametern ein signifikanter Unterschied zwischen BRS und DES. **Tabelle 11** gibt einen Überblick.

		EEL-Fläche [mm²]				IEL-Fläche [mm²]			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	4,92	4,69	5,16	0,0001*	4,69	4,46	4,93	0,0001*
	DES (n=20)	6,55	6,42	6,68		6,37	6,24	6,50	
systemisch	Statin (n=10)	5,63	5,38	5,89	0,616	5,42	5,17	5,69	0,624
	Placebo (n=10)	5,72	5,49	5,96		5,51	5,27	5,75	
p of interaction		0,828				0,994			

		Mediafläche [mm²]				Neointimafläche [mm²]			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	0,23	0,21	0,25	0,0001*	3,22	2,96	3,48	0,0001*
	DES (n=20)	0,18	0,16	0,20		2,27	2,04	2,50	
systemisch	Statin (n=10)	0,21	0,19	0,23	0,807	2,72	2,34	3,10	0,851
	Placebo (n=10)	0,20	0,18	0,23		2,77	2,51	3,03	
p of interaction		0,044				0,662			
		Neointima-Dicke über den struts [mm]				Neointima-Dicke zwischen den struts [mm]			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	0,38	0,33	0,42	0,0001*	0,63	0,51	0,79	0,0001*
	DES (n=20)	0,16	0,13	0,19		0,27	0,24	0,31	
systemisch	Statin (n=10)	0,27	0,21	0,32	0,924	0,39	0,34	0,46	0,400
	Placebo (n=10)	0,27	0,23	0,31		0,44	0,35	0,56	
p of interaction		0,453				0,181			
		Lumen-Fläche [mm²]				% Stenose			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	1,47	1,28	1,69	0,0001*	68,64	64,82	72,69	0,0001*
	DES (n=20)	4,10	3,91	4,30		35,54	32,33	39,03	
systemisch	Statin (n=10)	2,44	2,20	2,71	0,912	49,33	44,22	55,03	0,977
	Placebo (n=10)	2,46	2,17	2,80		49,43	45,39	53,84	
p of interaction		0,817				0,577			
		% frei liegende struts							
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert				
lokal	BRS (n=20)	0,00	0,00	0,00	0,0001*				
	DES (n=20)	15,58	8,98	27,02					
systemisch	Statin (n=10)	0,038	0,025	0,058	0,786				
	Placebo (n=10)	0,041	0,029	0,059					
p of interaction		0,786							

Tabelle 11: Histologie-Morphometrie-Ergebnisse nach 161 Tagen

Nach 161 Tagen hatte die EEL-Fläche und damit der Gefäßquerschnitt im BRS weiter abgenommen, während der Wert im DES stabil geblieben war ($4,92 \text{ mm}^2$ (CI: 4,69, 5,16) vs. $6,55 \text{ mm}^2$ (CI: 6,42, 6,68); $p < 0,0001$). Die Neointima hat in beiden Devices zugenommen, der DES wies jedoch auch nach 161 Tagen noch frei liegende Stentstreben auf (% frei liegende *struts*: 0,00% im BRS (CI: 0,00, 0,00) vs. 15,58% (CI: 8,98, 27,02) im DES; $p < 0,0001$). Weiterhin zeigte der BRS eine deutlich stärker entwickelte Neointima (Neointimafläche: $3,22 \text{ mm}^2$ (CI: 2,98, 3,48) vs. $2,27 \text{ mm}^2$ (CI: 2,04, 2,50); $p < 0,0001$). Die prozentuale Stenose betrug 68,64% im BRS (CI: 64,82, 72,69) und 35,54% im DES (CI: 32,33, 39,03) ($p < 0,0001$) (vgl. **Abbildung 21**).

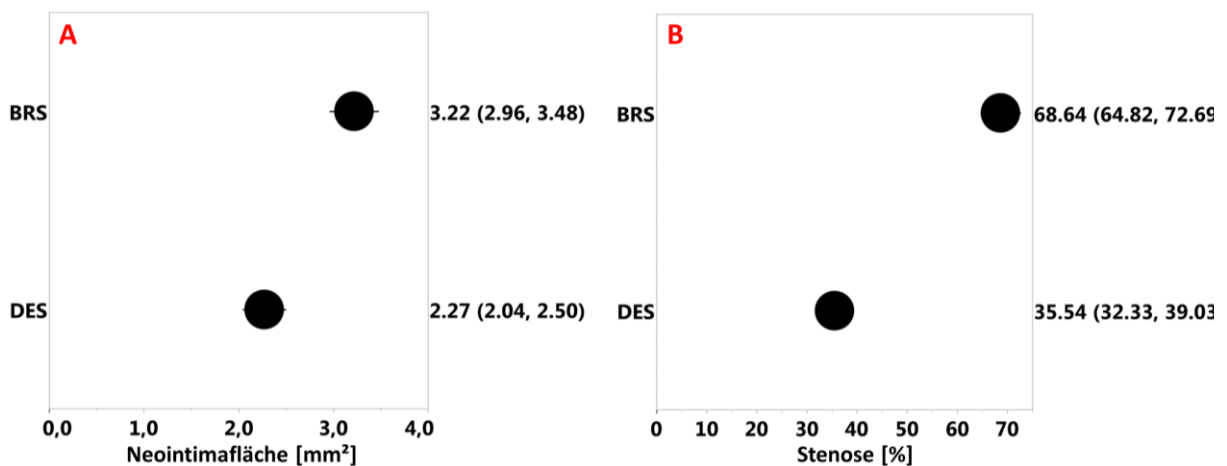


Abbildung 21: Neointimafläche und % Stenose in BRS und DES

Die Ergebnisse der Neointima-Messungen im Vergleich zwischen BRS und DES (21A), sowie die Resultate der errechneten prozentualen Stenose in beiden Devices (21B), dargestellt als Forest-plot. Bei den Werten handelt es sich um geschätzte Mittelwerte mit unterem und oberem CI.

Bereits die Angiografie-Aufnahmen im Rahmen der Euthanasie zeigten häufig die aus der ausgeprägten Neointimaproliferation resultierende Stenosierung im BRS (vgl. **Abbildung 22**), welche in der Histologie noch deutlicher erkennbar war (siehe **Abbildung 23**).

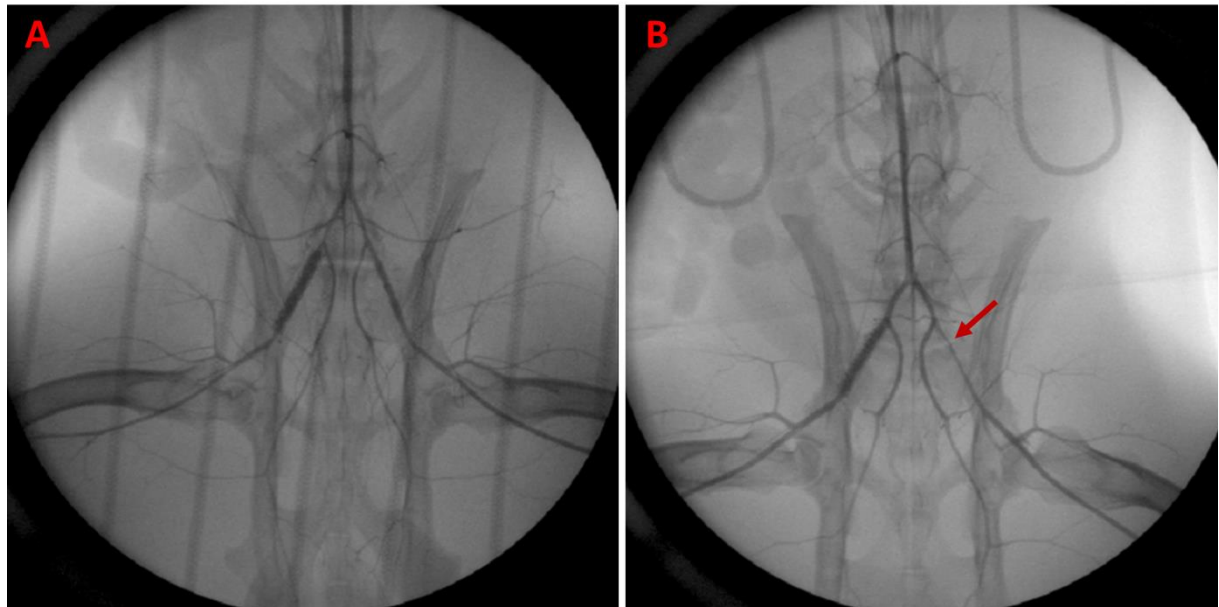


Abbildung 22: Finale Angiografie-Aufnahmen

Während nach 91 Tagen die Neointimaproliferation im BRS noch nicht zu deutlicher Stenose führt (22A), ist nach 161 Tagen eine deutliche Reduktion des Kontrastmittelflusses in der mit BRS behandelten Arterie erkennbar (22B). Die Stenose ist mit Pfeil markiert.

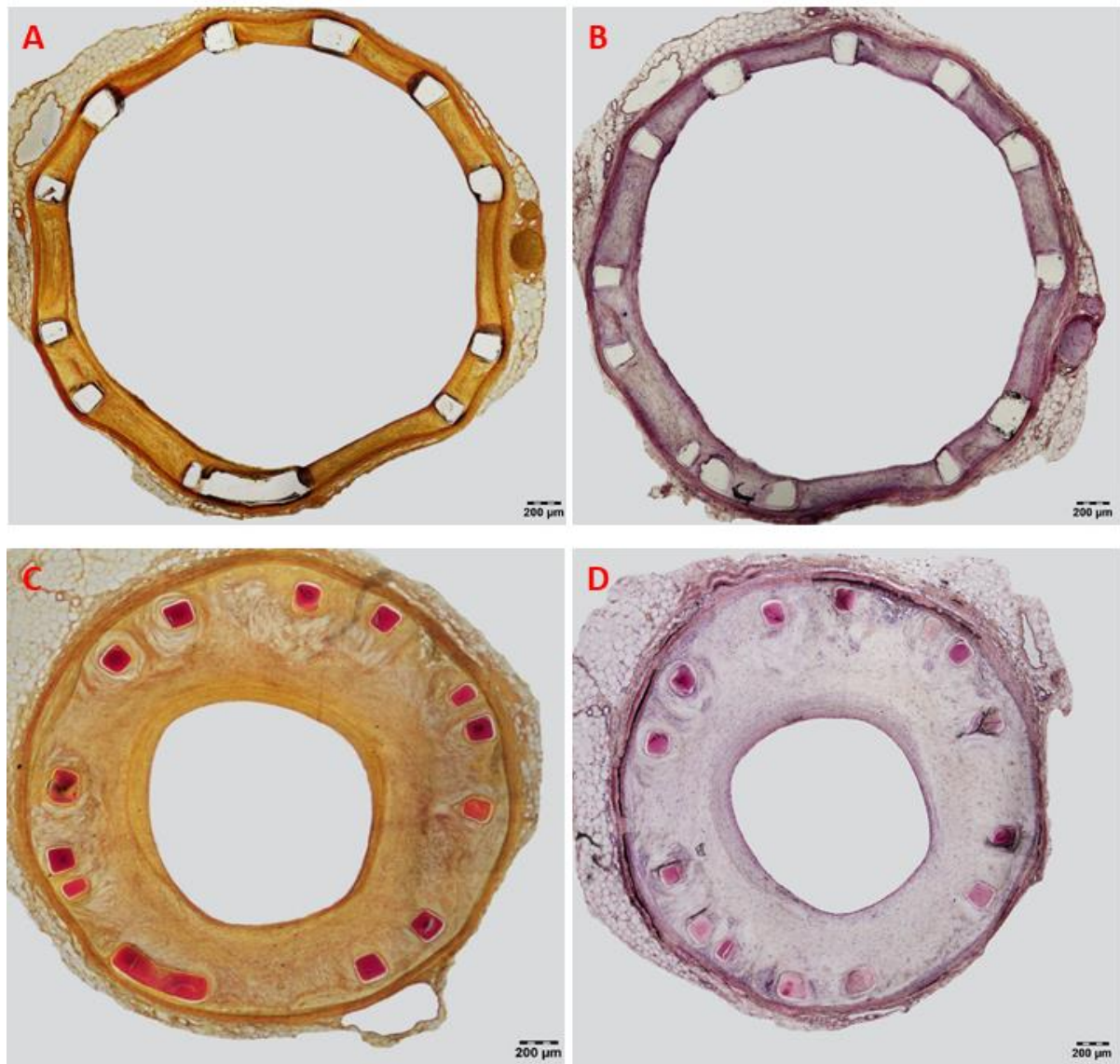


Abbildung 23: HE- und VVG-gefärbte Gefäßquerschnitte

In den Schnitten aus dem DES (23A und 23B) sind auch nach 161 Tagen noch frei liegende Stentstreben erkennbar. Die Schnitte aus dem BRS (23C und 23D) zeigen die ausgeprägten Proliferationsvorgänge der Neointima mit Abnahme des Lumens. VVG-Färbung: A und C; HE-Färbung: B und D.

6.2.2 Semi-quantitative Auswertung der histologischen Schnitte

Die Auswertung der Einheilungsparameter zeigte weitgehend vergleichbare Ergebnisse in BRS und DES. Es fanden sich im *peri-strut*-Gewebe des BRS mehr Streben mit Residuen von Einblutungen (Hämosiderin) (15,50% (CI: 11,48, 20,95) vs. 4,84% (CI: 3,39, 6,92); $p < 0,0001$). Der Verletzungs-Score war dagegen in beiden Devices ähnlich niedrig (0,40 im BRS (CI: 0,35, 0,45) vs. 0,42 im DES (CI: 0,34, 0,49); $p = 0,776$). Auch nach 161 Tagen war die entzündliche Reaktion des Gewebes in beiden Stenttypen moderat mit einem Entzündungs-Score von 1,53

im BRS (CI: 1,31, 1,75) und 1,24 im DES (CI: 1,01, 1,47) ($p = 0,106$). Bei der Beurteilung der Infiltration mit mehrkernigen Riesenzellen fanden sich diese Zellen immer noch häufiger rund um BRS-*struts*, jedoch war der Unterschied zum späteren Follow-up-Zeitpunkt nicht mehr signifikant (9,33% (CI: 6,76, 11,90) vs. 7,70% (CI: 5,92, 9,47); $p = 0,335$). Alle evaluierten Parameter einschließlich der Resultate des Vergleichs der systemischen Therapie finden sich in

Tabelle 12.

		% Einblutung				% mehrkernige Riesenzellen			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	15,50	11,48	20,95	0,0001*	9,33	6,76	11,90	0,335
	DES (n=20)	4,84	3,39	6,92		7,70	5,92	9,47	
systemisch	Statin (n=10)	8,83	6,67	11,69	0,890	8,90	6,65	11,15	0,601
	Placebo (n=10)	8,50	5,40	13,38		8,13	6,29	9,96	
p of interaction		0,728				0,532			
		% Endothelialisierung				% Kalzifizierung			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	26,09	19,52	32,67	0,338	70,90	63,15	79,61	0,364
	DES (n=20)	22,64	17,36	27,92		76,19	68,75	84,43	
systemisch	Statin (n=10)	22,98	16,88	29,07	0,570	71,43	63,30	80,61	0,470
	Placebo (n=10)	25,76	18,33	33,18		75,63	68,67	83,28	
p of interaction		0,008*				0,117			
		Entzündungs-Score				Verletzungs-Score			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert	Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	1,53	1,31	1,75	0,106	0,40	0,35	0,45	0,776
	DES (n=20)	1,24	1,01	1,47		0,42	0,34	0,49	
systemisch	Statin (n=10)	1,46	1,27	1,65	0,293	0,43	0,36	0,51	0,311
	Placebo (n=10)	1,31	1,11	1,51		0,39	0,34	0,44	
p of interaction		0,054				0,426			

Tabelle 12: Semi-quantitative Evaluierung der histologischen Schnitte nach 161 Tagen

6.2.3 Neoatherosklerose-Score in den histologischen Schnitten

Die mittels Histologie-Neoatherosklerose-Score beurteilte Schaumzell-Belastung der Neointima bestätigte das Ergebnis des OCT-Neoatherosklerose-Scores. Während die BRS-Neointima einen gleichbleibend niedrigen Score aufwies, konnten v. a. im lumennahen Gewebe der Neointima des DES vermehrt Schaumzellen als Anzeichen für eine Neoatherosklerose-Progression gefunden werden (siehe **Abbildung 24**).

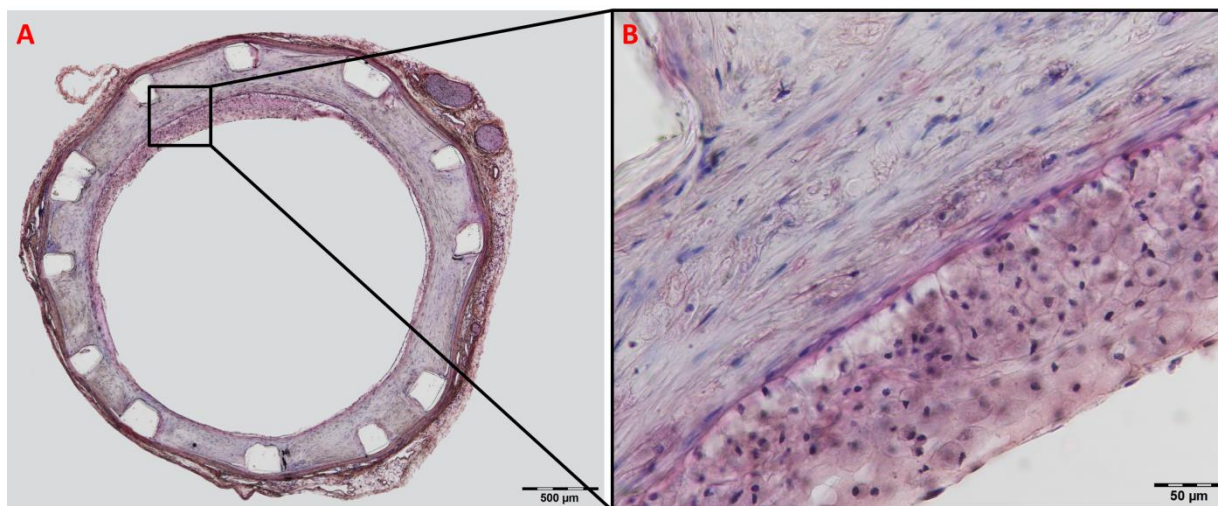


Abbildung 24: Schaumzellinfiltration in der Histologie

Querschnitt aus einem DES mit halbmondförmiger, luminaler Neoatherosklerose (24A) und 20-fache Vergrößerung aus der Neointima in der deutlich die Schaumzellen erkennbar sind (24B).

Mit einem Score von 1,16 im BRS (CI: 1,12, 1,21) und einem Score von 1,53 im DES (CI: 1,41, 1,65) fand sich ein hoch-signifikanter Unterschied zwischen den lokalen Therapien ($p < 0,0001$). Zeigte sich in der OCT-Evaluierung der neoatherosklerotischen Veränderungen kein signifikanter Unterschied zwischen Statin und Placebo, so führte der Vergleich der systemischen Therapie in der Histologie zu einem signifikant niedrigeren Neoatherosklerose-Score unter Atorvastatin-Therapie (1,23 (CI: 1,14, 1,32) vs. 1,45 (CI: 1,36, 1,54); $p = 0,001$) (vgl. **Abbildung 25**). Das p of interaction zwischen lokaler und systemischer Therapie liegt bei 0,005 (vgl. **Tabelle 13**).

		Neoatherosklerose-Score			
		Mittelwert	unteres 95% CI	oberes 95% CI	p-Wert
lokal	BRS (n=20)	1,16	1,12	1,21	0,0001*
	DES (n=20)	1,53	1,41	1,65	
systemisch	Statin (n=10)	1,23	1,14	1,32	0,001*
	Placebo (n=10)	1,45	1,36	1,54	
p of interaction		0,005*			

Tabelle 13: Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scorings in der Histologie nach 161 Tagen

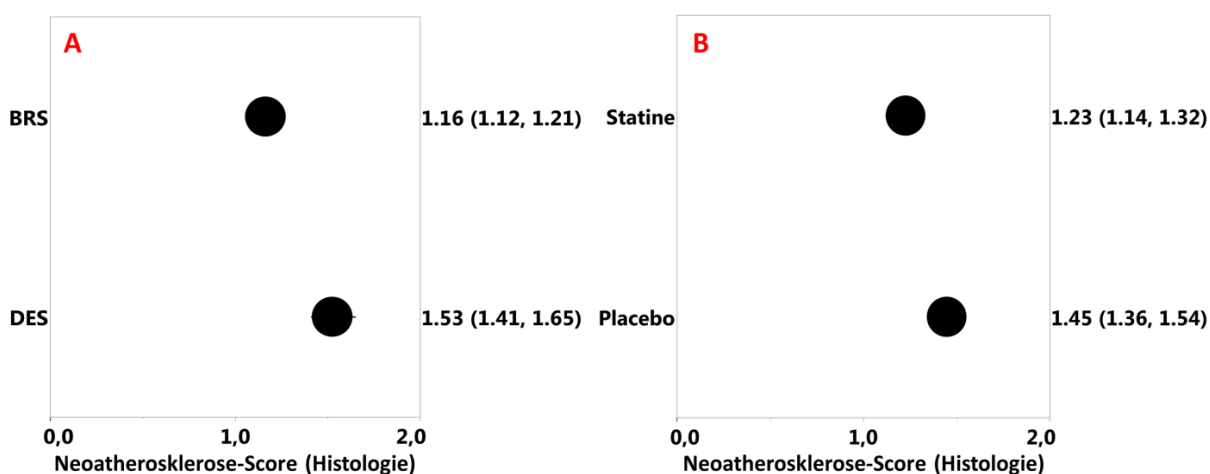


Abbildung 25: Ergebnisse des Histologie-Neoatherosklerose-Scores

Die Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scorings in der Histologie, dargestellt als Forest-plot mit dem Vergleich zwischen BRS und DES (25A), sowie den Vergleich Statin und Placebo (25B). Bei den Werten handelt es sich um geschätzte Mittelwerte mit unterem und oberem CI.

6.2.4 Qualitative Beschreibung der histologischen Schnitten

Insbesondere im BRS präsentierte sich die Neointima homogen mit Proteoglykan-reicher Grundsubstanz und glatten Muskelzellen. In der Umgebung der Stentstreben fanden sich Anzeichen von entzündlicher Reaktion mit eingewanderten neutrophilen Granulozyten. Gerade im BRS jedoch auch Zellen der monozytären Reihe und mehrkernige Riesenzellen. Schaumzellen fanden sich vermehrt im DES und durchsetzten hier häufig die lumennahen Gewebeschichten. Im BRS waren *foam cells* insgesamt seltener zu finden. Neben Schaumzellen konnten auch Cholesterinkristalle und Neovaskularisation als Anzeichen für neoatherosklerotische Veränderungen gefunden werden. Einblutungen waren als Blutungs-Residuen in Form von gelb-

bräunlichem Hämosiderin in tiefen Neointimaschichten nachweisbar. Kalzifizierungen konnten nur in *struts* und im peri-*strut*-Gewebe gesehen werden. In **Abbildung 26** findet sich eine Übersicht über die Befunde.

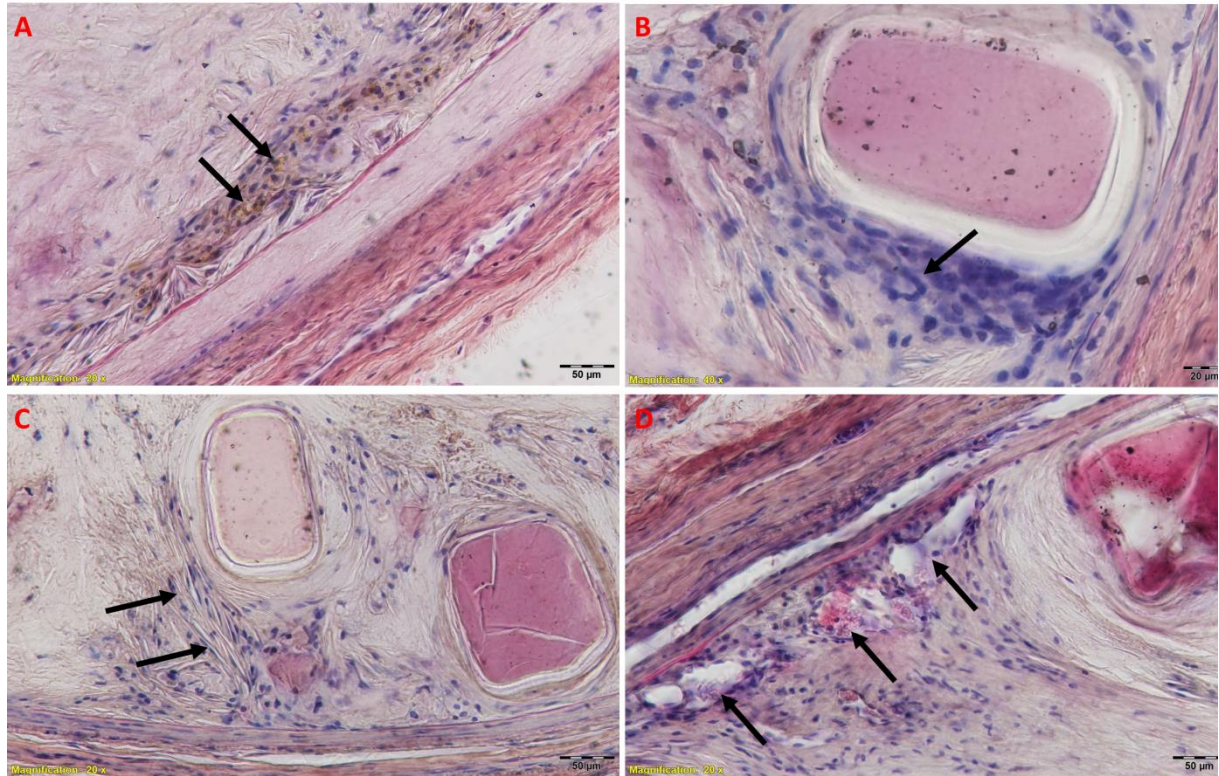


Abbildung 26: Überblick über typische Befunde der Histologie

Hämosiderinablagerungen als Reste von Einblutung in die Neointima (26A), entzündliche Reaktion im peri-*strut*-Gewebe mit mehrkerniger Riesenzelle (26B), leere Spalten als Überbleibsel von Cholesterinkristallen (26C), sowie Neovaskularisation in der Neointima (26D).

VI DISKUSSION

Unter Neoatherosklerose versteht man das Auftreten neuer atherosklerotischer Plaques im Bereich der sich entwickelnden Neointima nach Stentimplantation. Sie ist in Frühstadien charakterisiert durch das Einwandern von Makrophagen und Lipiden, welche das typische Bild von Schaumzellen verursachen. Das Auftreten von neoatherosklerotischen Veränderungen in implantierten Koronarstents stellt ein bedeutendes Problem im klinischen Alltag dar, da Neoatherosklerose Mitverursacher von Stentversagen und damit mitunter fatalen Koronarereignissen ist. Obwohl noch wenig über diese Manifestationsform der Atherosklerose bekannt ist, weiß man mittlerweile, dass DES deutlich schneller und häufiger betroffen sind als BMS. Autopsiestudien haben gezeigt, dass in diesen Stents bereits wenige Monate nach Implantation neoatherosklerotische Veränderungen vorhanden sein können⁷⁵. Da DES die am häufigsten eingesetzten Stents bei der Behandlung von Läsionen mittels PCI sind, stellt dies ein besorgniserregendes Problem dar. Von den alleine in Deutschland über 339.000 Stents, die 2016 implantiert wurden, waren über 90% DES⁶⁷. Obwohl sich DES der 2. und 3. Generation durch eine optimierte Biokompatibilität auszeichnen, konnte bislang keine Reduktion hinsichtlich des Auftretens von Neoatherosklerose nachgewiesen werden¹¹³.

Als Ursache werden Störungen bei der Re-Endothelialisierung des Stents diskutiert. Außerdem geht man davon aus, dass der Metallkäfig permanenter Stents die physiologischen Gefäßfunktionen unterbindet und dadurch ebenfalls zur Neoatheroskleroseentstehung beiträgt. Deshalb werden in BRS große Hoffnungen gesetzt, die der erste zugelassene, vollständig resorbierbare PLLA-Scaffold jedoch nicht erfüllen konnte. Die Vommarknahme des AbsorbTM war ein Rückschlag für diese Technologie, jedoch unterscheiden sich die Resorptionsvorgänge und -zeiten aufgrund der eingesetzten Materialien und angestrebten Resorptionszeiten zwischen den verschiedenen Scaffold-Technologien erheblich. So kann nicht von einem BRS auf weitere Scaffolds geschlossen werden.

In der hier vorgestellten Tierstudie wurde ein resorbierbarer Magnesium-Scaffold untersucht, wobei das Hauptaugenmerk auf dem Einfluss des Stents auf die Neoatherosklerose lag. Die Ergebnisse zeigen einen positiven Effekt des Magnesium-Scaffolds auf die Entwicklung und das Voranschreiten neoatherosklerotische Läsionen im Kaninchenmodell. Es bleibt abzuwarten, ob

sich dieser durchwegs positive Effekt im präklinischen Tiermodell auch in Humanstudien bestätigen lassen wird.

Da die Zusammenhänge, die zum Auftreten von neoatherosklerotischen Läsionen führen, die tatsächliche Prävalenz neoatherosklerotischer Läsionen ebenso wie die Therapie dieser Manifestationsform der Atherosklerose unklar sind, besteht hier dringend Forschungsbedarf. Prospektive, invasive Bildgebungsstudien im Menschen (z. B. mittels OCT) sind jedoch sehr aufwendig in der Durchführung und ein Vergleich der Ergebnisse mit dem Goldstandard der Histologie ist unmöglich. Deshalb sind präklinische Studien unverzichtbar. Im Folgenden sollen einzelne Aspekte der Studie diskutiert werden.

1 Ergebnisse aus Gruppe 1

Nach 91 Tagen im Versuch wurden die Kaninchen in Gruppe 1 euthanasiert, während die verbleibenden Tiere randomisiert der Statin- oder Placebo-Gruppe zugeteilt wurden. Die Evaluierung der OCT-Untersuchungen und histologischen Schnitte der Gruppe-1-Kaninchen zeigte sofort den Erfolg der Neoatherosklerose-Induktion im gewählten Kaninchenmodell. Sowohl in den OCT-*pullbacks* als auch unter dem Mikroskop ließen sich Schaumzellinfiltrate nachweisen. Die Ergebnisse zeigten bereits eine Tendenz zu einem besseren Abschneiden des BRS hinsichtlich der Neoatherosklerose.

Gruppe 1 diente insbesondere dazu, den Gefäßzustand vor Gabe des Statins zu erfassen und damit Aussagen über das Voranschreiten von Veränderungen in Gruppe 2 und 3 tätigen zu können. Direkt in Korrelation konnten die Ergebnisse nach 91 und 161 Tagen jedoch nicht gesetzt werden, da die präsentierten Ergebnisse aus verschiedenen Tieren stammten. Eine zusätzliche OCT-Untersuchung der Kaninchen aus Gruppe 2 und 3 an Tag 91 hätte eine solche Korrelation ermöglicht. Gleichzeitig hätte ein solcher, zusätzlicher Eingriff aber eine weitere Belastung der Tiere bedeutet, auf die im Sinne der 3Rs und des Tierwohls verzichtet wurde.

Insgesamt zeigten die neoatherosklerotischen Veränderungen nach 91 Tagen verhältnismäßig stark ausgeprägt. Der OCT-Neoatherosklerose-Score lag bereits bei 1,13 (BRS) bzw. 1,32 (DES), der Neoatherosklerose-Score in der Histologie bei 1,18 (BRS) bzw. 1,43 (DES). 70 Tage später wurden ein Score von 1,20 (BRS) bzw. 2,09 (DES) in der OCT und ein Score von 1,16 (BRS) bzw.

1,53 (DES) in der Histologie erreicht. Dies kann unter Umständen mit der Gruppeneinteilung der Tiere, welche nicht vollrandomisiert erfolgen konnte, sowie insbesondere dem außerplanmäßig durchgeführten Wechsel zu Normalfutter in Gruppe 2 und 3 zusammenhängen. Diese Futterumstellung von dem 0,025%igen Cholesterinfutter auf die Normaldiät war an Tag 100 nötig geworden, nachdem sich im Rahmen der Statin-Therapie die Leberbelastung der Tiere so stark erhöht hatte, dass der Gefahr von Leberversagen entgegengewirkt werden musste. In der Folge wurde ein allmähliches Absinken des Cholesterinspiegels im Serum bei Tieren in Gruppe 2 und 3 beobachtet, sodass die Kaninchen in Gruppe 1 einen relativ höheren Cholesterinspiegel und dadurch relativ stärker ausgeprägte neoatherosklerotische Veränderungen hatten.

2 Ergebnisse der Statintherapie

Die Ergebnisse von Gruppe 2 und 3, also aus dem Vergleich zwischen Statintherapie und Placebo, müssen als uneindeutig eingestuft werden, da sich die Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scorings in Histologie und OCT nicht decken. Zwar zeigte sich in der histopathologischen Evaluation nach 161 Tagen ein signifikanter Unterschied der Neoatherosklerose-Ausprägung (1,23 (Statin) vs. 1,45 (Placebo); $p = 0,001$), im Rahmen des OCT-Neoatherosklerose-Scorings konnte jedoch kein Unterschied zwischen Gruppe 2 und 3 gezeigt werden (1,57 (Statin) vs. 1,60 (Placebo); $p = 0,873$). Dies ist zweifelsohne auf den vorzeitigen Abbruch der Statinbehandlung zurückzuführen. Statt der geplanten Medikation über 70 Tage (von Tag 91 bis 161) erhielten die Kaninchen in Gruppe 2 nur für 10 Tage Atorvastatin. Zeitgleich wurde auch die Placebogabe eingestellt.

Über einen solch kurzen Zeitraum kann schwerlich ein wirklicher Effekt des Medikaments erwartet werden. Die erzielten Ergebnisse müssen entsprechend kritisch betrachtet werden. Insbesondere zeigt das p of interaction zwischen dem signifikanten Ergebnis der systemischen und der lokalen Therapie im Histologie-Neoatherosklerose-Score eine Interaktion ($p = 0,005$).

Die hepatotoxischen Nebenwirkungen einer länger andauernden cholesterinreichen Fütterung auf Kaninchen sind bekannt¹²⁶ und auch das hier vorgestellte Tiermodell zeigte, dass die Leberbelastung der Tiere hoch ist. Die zusätzliche Beanspruchung dieses Organs durch das Statin resultierte in beginnendem Leberversagen bei allen Gruppe-2-Kaninchen. Eine Fortführung der Statintherapie hätte unter diesen Bedingungen nicht nur keinen Sinn gehabt,

sondern auch als unvereinbar mit dem Tierschutz eingestuft werden müssen. Darüber hinaus hätten Verluste von Versuchstieren aufgrund von Leberversagen das gesamte Projekt gefährden können. Aus diesem Grund wurden Statin- und Placebogabe zeitgleich eingestellt und den Tieren wieder Normaldiät gefüttert, um die Leber zu entlasten und das Experiment bis Tag 161 fortführen zu können.

3 Neoatherosklerose-Scoring in Histologie und OCT

Bei Tieren aller drei Versuchsgruppen wurde ein „doppeltes“ Scoring der neoatherosklerotischen Veränderungen durchgeführt, einerseits mittels OCT, andererseits durch histopathologische Auswertung.

Aufgrund ihrer hohen axialen Auflösung, die andere intravaskuläre Bildgebungsverfahren aussticht, hat sich die OCT-Untersuchung zu einem vielgenutzten Verfahren im Rahmen einer PCI entwickelt und wird bereits als Gold-Standard der In-vivo-Bildgebung von Koronarstents angesehen^{101,153}. Die OCT hat jedoch auch entscheidende Nachteile, vor allem die geringe Eindringtiefe⁹⁹, die sich sicherlich auch in diesem Tiermodell auswirkte. Insbesondere im BRS führte die ausgeprägte Neointimaproliferation dazu, dass lediglich die oberen Schichten der Neointima evaluiert werden konnten. Stentstreben sind dadurch nach 161 Tagen häufig nicht mehr erkennbar und somit auch eine Beurteilung des *peri-strut*-Gewebes unmöglich.

Der präklinische Versuch bietet die einzigartige Möglichkeit, in-vivo akquirierte Daten durch die Histopathologie zu ergänzen und zu validieren.

Aus diesem Grund wurden zwei getrennte Scoring-Systeme, eines für die Evaluierung der Neoatherosklerose in der OCT, das andere für die Histologie, verwendet. In unserem Versuch deckten sich die Scoring-Ergebnisse. Beide Untersuchungsverfahren und Scores zeigten eine Reduktion der Neoatherosklerose im BRS und legen damit dessen Überlegenheit über einen designgleichen DES nahe.

4 Die Ergebnisse des BRS

Alle implantierten Stents wurden denselben Untersuchungsverfahren, bestehend aus OCT mit Morphometrie und Neoatherosklerose-Scoring, sowie Histopathologie mit Morphometrie, Neoatherosklerose-Score und weiteren semi-quantitativen Scores, unterzogen.

Neoatherosklerose: Beide Neoatherosklerose-Score-Systeme zeigten ein signifikant besseres Abschneiden des BRS im Vergleich zum DES auf. In Literaturquellen wird die Reduktion von Neoatherosklerose als möglicher Vorteil von BRS aufgeführt¹⁰. Die vorliegende Studie scheint solche Hoffnungen zu untermauern. Die Aussagekraft von Tierversuchen und die Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Menschen ist jedoch begrenzt. Einzelne humane Fallberichte beschreiben neoatherosklerotische Veränderungen in bioresorbierbaren Stents^{119,120,154}. In all diesen Publikationen wurde jedoch ein Absorb™-Stent implantiert. Fallberichte des Magmaris® zu Neoatherosklerose konnten zum Zeitpunkt der Publikation keine gefunden werden. Auswertungen von Autopsie-Registern und klinische Studien bleiben abzuwarten.

Entzündungsreaktion: Mittels immunhistochemischer Färbungen (Daten einer Co-Doktorandin, hier nicht gezeigt) von Querschnitten aus beiden Stents sollten zusätzliche Informationen über die Schaumzellinfiltration in unserem Tiermodell gewonnen werden. Das Gewebe wurde mit RAM-11 (RAM = *Rabbit Anti-Macrophage*) angefärbt, dabei handelt es sich um einen Antikörper, der häufig zur Anfärbung von Schaumzellen verwendet wird¹⁵⁵. RAM-11-gefärbte Schnitte des DES zeigten ausgeprägte Schaumzellinfiltrationen in der oberflächlichen Neointima. Im BRS färbten sich dagegen vor allem Zellen im peri-strut-Gewebe der tiefen Neointima. Bei eingehenden Betrachtungen dieser Zellinfiltrate unter dem Mikroskop konnten diese Zellen jedoch nicht als Schaumzellen angesprochen werden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich um Monozyten handelt, die aufgrund der mit der Degradation des BRS einhergehenden Entzündungsreaktion in das Gewebe eingewandert sind. So handelt es sich bei RAM-11 um einen Antikörper, der spezifisch an Kaninchen-Makrophagen, jedoch nicht nur an Schaumzellen bindet.

Monozyten, die einmal aus dem Blut ins Gewebe eingewandert sind, können nicht mehr zurück in die Zirkulation. Sie differenzieren sich dort zu Makrophagen aus¹⁵⁶. Als solche beteiligen sie

sich an der lokalen Entzündungsreaktion und wirken bei der Degradation mit. Diese Situation stellt einen Zustand erhöhten oxidativen Stresses dar¹⁵⁷. Im Hinblick auf die im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose vorgestellten Vorgänge und die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies besteht die Möglichkeit, dass sich diese entzündlichen Vorgänge gerade bei zeitgleich bestehender Hypercholesterinämie langfristig negativ auf die Progression von neoatherosklerotischen Veränderungen auswirken⁹². Publierte präklinische Studien des Magmaris® mit langen Implantationszeiten bis zu zwei Jahren wurden in gesunden Schweine- und Kaninchenmodellen durchgeführt und eignen sich deshalb nicht zum Vergleich mit unserer Fragestellung¹⁴². Studien mit langem Follow-up im (neo-)atherosklerotischen Kaninchenmodell sind aufgrund der auftretenden Hepatotoxizität limitiert. Langzeitstudien in Schweinen auf cholesterinreicher Diät erscheinen am ehesten geeignet, die Situation im humanen Patienten darzustellen. Sie sind jedoch aufwendig und teuer.

Neointimaproliferation: In der Publikation von Waksman et al. wird der Magmaris® unter anderem gegen einen handelsüblichen DES (XIENCE V®, Abbott Vascular) verglichen. In dieser Studie zeigte sich eine signifikant ausgeprägtere Neointimaproliferation im BRS, die Neointimafläche blieb jedoch im Versuchszeitraum von 28 bis 730 Tagen weitgehend stabil. Die Neointimafläche im Magmaris® lag an Tag 180 im Mittel bei 2.36 mm², an Tag 730 bei 2.58 mm²¹⁴². In unserer Studie an Kaninchen mit (neo-)atherosklerotischen Veränderungen lag der Mittelwert der Neointimafläche nach 161 Tagen bei 3,22 mm². Auch die Werte im von uns verwendeten DES überstiegen die des XIENCE in der Waksman-Studie.

Die von uns beobachtete Proliferation der Neointima war stark ausgeprägt und führte im BRS teilweise zu deutlicher Stenosierung des Gefäßlumens. Die Ursachen hierfür sind nicht klar ersichtlich und vermutlich multifaktoriell. Dass die Untersuchungen im (neo-)atherosklerotischen Tier durchgeführt wurden, spielt wahrscheinlich eine Rolle. Ebenso wird die an Tag 63 durchgeführte zweite Denudation ein erneutes Neointimawachstum hervorgerufen haben, auch wenn Waksman und Kollegen zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt noch anti-proliferatives Medikament eluiert wird. Diese beiden Einflussfaktoren treffen jedoch auf beide implantierten Stenttypen zu und können zwar das von uns beobachtete insgesamt stärker ausgeprägte Wachstum der Neointima in unserem Versuch, nicht jedoch den drastischen Unterschied zwischen den beiden Stents erklären.

Weiterführende Erforschung und Verbesserungen des Magmaris® werden nötig sein, da davon auszugehen ist, dass die Situation im Cholesterin-gefütterten Kaninchen eher dem Zustand im Humanpatienten entspricht, als ein gesundes Tiermodell. Stenosen, wie hier beobachtet, können im Menschen klinisch relevant werden und sich im erneuten Auftreten von Ischämie-Symptomen wie Angina pectoris äußern. Zudem ist bekannt, dass zwischen Neointimahyperplasie und Neoatherosklerose ein Zusammenhang besteht^{158,159}.

Endothelialisierung: Sowohl die Entstehung von Neoatherosklerose, als auch die anhaltende Proliferation der Neointima können mit der Endothelialisierung oder einem Mangel derselben zusammenhängen⁹. Heute geht man davon aus, dass das anti-proliferative Medikament des DES sowohl das Wachstum der Endothelzellen als auch die Reifung der *tight junctions* hemmt¹⁶⁰. Die Re-Endothelialisierung ist gestört. Dadurch kann einerseits Cholesterin leichter in subendotheliales Gewebe eindringen, andererseits setzt sich das von den VSMCs ausgehende Wachstum der Neointima fort^{113,161}. Deshalb wurde in den HE-Querschnitten auch die Entwicklung der Endothelzellen untersucht. Die Ergebnisse legten eine schlechte Endothelialisierung beider Devices nahe, jedoch gibt es eine Reihe von Punkten, die dieses Resultat relativieren. Zunächst sind Querschnitte nicht besonders gut geeignet, um diesen einschichtigen Zellverband zu beurteilen. Außerdem wurden im Rahmen der Euthanasie Imaging-Katheter durch die Gefäße geführt, wobei das Endothel geschädigt werden kann. Und auch im Rahmen der Aufbereitung für die Histologie können Schäden nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen der Dissertation einer Kollegin eine zusätzliche Versuchsgruppe nach dem gleichen Studiendesign gestartet, bereits nach 35 Tagen euthanasiert und die Stent-Längsschnitte mittels en-face SEM (*scanning electron microscopy*) untersucht. Die hier nicht präsentierten Daten zeigten bereits nach 35 Tagen eine weit fortgeschrittene Endothelialisierung des BRS, welche statistisch hoch-signifikant besser war als im DES. Auch bei der qualitativen Beurteilung der *tight junctions* erschienen diese gesünder. Das positive Abschneiden des Magmaris® bei der neoatherosklerotischen Evaluierung kann damit erklärt werden. Ursachen für die ungebremste Neointimaproliferation und daraus resultierende hohe % Stenosen bleiben jedoch unklar.

Degradation: Ein weiterer Faktor, die EEL-Fläche, kann Einfluss auf die beobachteten hohen Werte der %-Stenose haben. Sie repräsentiert den Gefäßquerschnitt. Die EEL-Fläche ist im BRS deutlich kleiner als im DES. Da es keine OCT-Aufnahmen gibt, welche den Zustand unmittelbar

post-implantationem zeigen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Unterschied auf eine geringere Dilatation des bioresorbierbaren Devices bei Implantation zurückzuführen ist. Der Verletzungs-Score in beiden Stenttypen ist jedoch sehr ähnlich, sodass es naheliegt, eine vergleichbare Expansion des Stentgerüsts in die Gefäßwand zu vermuten. Außerdem zeigen post-implantationem erstellte Angiografie-Aufnahmen vergleichbare Dilatationszustände in BRS und DES (vgl. **Abbildung 27**).

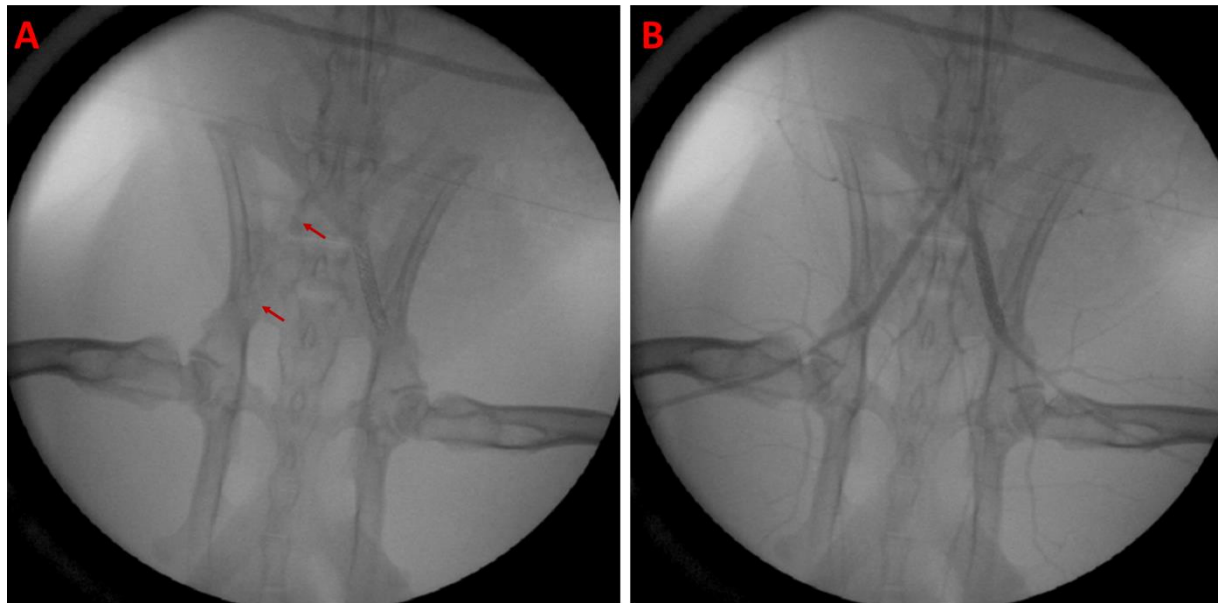


Abbildung 27: Nach der Stentimplantation erstellte Angiografie-Aufnahmen

Der BRS wurde in die RIA implantiert, die röntgengedichteten Marker sind kaum erkennbar (Pfeile) (27A). Das Kontrastmittel-Angiogramm zeigt einen ähnlichen Dilatationszustand in beiden Stents (27B).

Eine Erklärung für die geringe EEL-Fläche liegt in der Degradation des Magmaris®, im Rahmen derer die Stützwirkung des Devices auf die Gefäßwand abnimmt. So zeigte sich eine Abnahme der EEL-Fläche von 5,57 mm² nach 91 Tagen auf 4,92 mm² nach 161 Tagen. Die Stützwirkung des permanenten Metallstents bleibt dagegen erhalten, die EEL-Fläche ist stabil. Die im BRS beobachtete Reduktion der EEL-Fläche bedeutet eine Abnahme des Gefäßquerschnitts und damit auch des Lumens. In der Folge steigt die %-Stenose an.

Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Fixation der Gefäße einen Einfluss hat. So führen Vorpahl und Kollegen den auch von ihnen beobachteten Unterschied des Gefäßdurchmessers zwischen BRS und DES auf die durchgeführte Formalinfixation zurück¹⁶². Im Rahmen der Degradation des BRS nimmt die Radialkraft des BRS ab, sodass sich das BRS-behandelte Gefäß

im Gegensatz zur mit DES behandelten Arterien im Rahmen der Formalinfixierung zusammenziehen kann.

Ein weiterer Punkt, der Einfluss auf die Stenose haben kann, besteht darin, dass im BRS im Rahmen der Degradation auch die Vasomotion des Gefäßes wieder möglich wird. In-vivo könnte eine kompensatorische Vasodilatation der Stenose entgegenwirken. Dies konnte mit dieser Studie jedoch nicht beurteilt werden, da keines der angewandten Untersuchungsverfahren den Zustand in-vivo richtig darstellte. Im Rahmen der Euthanasie wurde die Bauchaorta ligiert und eine Schleuse eingebracht, bevor die Iliakalarterien mittels Kontrastmittel-Röntgen dargestellt wurden. Zu diesem Zeitpunkt herrschten also bereits keine physiologischen Bedingungen mehr. Die OCT-Untersuchungen wurden zusätzlich nach der Euthanasie des Tieres und unter Blutleere durchgeführt. Studien zu verschiedenen Follow-up-Zeitpunkten mit In-vivo-Beurteilung des Lumens und Tests auf Vasomotion des Gefäßes wären nötig. Im Rahmen der BIOSOLVE-II-Studie konnte Vasomotion in den mit Magmaris® behandelten Gefäße gezeigt werden^{94,95}.

Zuletzt muss die Möglichkeit des sog. *positive remodelling* berücksichtigt werden. Darunter versteht man die positive Anpassungsreaktion eines Gefäßes auf eine Stenose, infolge derer über Dilatation eine kompensatorische Vergrößerung des Gefäßquerschnitts und damit des Lumens erreicht wird. Eine solche Reaktion auf übermäßige Neointimaproliferation nach dem Stenting ist in einem Gefäß, welches mit einem permanenten Stent behandelt wurde, unmöglich. In einer mittels BRS therapierten Arterie besteht diese Möglichkeit nach erfolgter Degradation jedoch. Es handelt sich also um einen erwarteten Vorteil des BRS. In unserer Studie konnte kein *positive remodelling* gezeigt werden. Die EEL-/IEL-Flächen nahmen von 91 auf 161 Tage ab. Unter Berücksichtigung der Degradation des Magmaris® (nach einem halben Jahr sind 66,5% des Scaffolds degradiert, nach einem Jahr ist der Magmaris® mit 94,8% fast vollständig resorbiert) ist jedoch davon auszugehen, dass Effekte wie *positive remodelling* und Vasomotion frühestens nach etwa 12 Monaten beobachtet werden können⁸³. Eine Studie mit längerem Follow-up und Untersuchungen z. B. nach 12 und 24 Monaten wäre nötig, um diese erhofften positiven Reaktionen der BRS-behandelten Gefäße zu evaluieren.

5 Limitationen

Wie jedes Tiermodell ist auch diese präklinische Kaninchenstudie dadurch limitiert, dass sich Ergebnisse aus dem Tier nicht ohne Weiteres auf die Situation im Humanpatienten übertragen lassen. Die Resultate der vorgestellten Studie können lediglich Ergebnisse aus humanen Studien ergänzen und versuchen Hintergründe zu beleuchten. Das „ideale“ (neo-)atherosklerotische Tiermodell existiert noch nicht. Kein gewählter Modellorganismus kann die komplexen Zusammenhänge humaner Atherosklerose vollständig abbilden. Zu den spezifischen Limitationen des Kaninchens zählt die unphysiologische, weil hepatotoxische Situation, die durch die länger andauernde Cholesterinfütterung erzeugt wird. Im vorgestellten Versuch verschärft das eingesetzte Atorvastatin die Lage noch. Der dadurch notwendige vorzeitige Abbruch der Statintherapie lässt weiterhin nur limitierte Aussagen zu den Effekten dieser Sekundärprävention zu.

Als weitere Limitation der vorliegenden Studie ist das relativ kurze Follow-up zu nennen. Positive Effekte der Bioresorption des Scaffolds, wie *positive remodeling* und Vasomotion, konnten zu diesem Zeitpunkt noch nicht beurteilt werden. Denkbare unerwünschte Zusammenhänge, z. B. zwischen vermehrter lokaler Entzündungsreaktion hervorgerufen durch die Bioresorption und später Progression der Neoatherosklerose, sind noch nicht absehbar. Mit Blick auf die Tatsache, dass im Menschen bereits wenige Monate nach Stentimplantation neoatherosklerotische Plaques festgestellt wurden, ist der Untersuchungszeitpunkt jedoch geeignet, das Auftreten früher neoatherosklerotischer Läsionen zu evaluieren. Während es außerdem mittels OCT möglich ist, neoatherosklerotische Anfangsstadien in Patienten zu detektieren, sind fortgeschrittene Läsionen, z. B. mit dicker fibröser Kappe, aufgrund der geringen Eindringtiefe des OCT-Signals unter Umständen nicht mehr zuverlässig zu erkennen⁷⁷. So kann ein früher Untersuchungszeitpunkt nicht nur Einblicke in die Pathophysiologie der Erkrankung liefern, sondern auch Hinweise auf die besten diagnostischen und therapeutischen Optionen aufweisen.

Darüber hinaus erscheint ein längerer Untersuchungszeitraum in diesem Kaninchenmodell unter Berücksichtigung von Belastung und Tierschutzaspekten schwierig. Insbesondere die Leberbelastung würde zwischen Phasen der Cholesterinfütterung immer wieder „Erholungsphasen“ auf Normaldiät erfordern. Untersuchungen im gesunden Tier, sei es

Kaninchen oder Schwein, ermöglichen zwar Aussagen über die Degradation des Scaffolds und eventuelle Erfolge der „*vascular restoration therapy*“, sind jedoch vom Einsatzgebiet des BRS in der humanen, atherosklerotisch veränderten Arterie weit entfernt. Auch Aussagen über neoatherosklerotische Veränderungen sind nicht möglich.

Darüber hinaus handelt es sich bei den von uns beobachteten Veränderungen lediglich um sehr frühe Stadien der Neoatherosklerose. Fortgeschrittene Läsionen konnten nicht beobachtet werden.

So lässt sich insgesamt festhalten, dass nur mittels Langzeitstudien in Humanpatienten abschließend über die Sicherheit und den Nutzen dieses BRS geurteilt werden kann. Die durchgeführte Studie in cholesterin-gefütterten Kaninchen erscheint dem Einsatzgebiet des untersuchten BRS für die Therapie atherosklerotischer Läsionen, trotz vorhandener Limitationen, jedoch näher als die Evaluierung solcher und ähnlicher intrakoronarer Devices in gesunden, juvenilen Schweinen. Im durchgeführten Modell erzielte der genutzte bioresorbierbare Scaffold im Vergleich zu einem designgleichen DES in Hinblick auf die Neoatheroskleroseentstehung bessere Ergebnisse.

VII ZUSAMMENFASSUNG

Bei Neoatherosklerose handelt es sich um die Formation eines Plaques in der Neointima einer bereits mittels Stents behandelten Arterie. Sowohl in BMS als auch in DES treten solche neoatherosklerotischen Veränderungen auf. Sie können bei Plaqueruptur zu Myokardinfarkt und im schlimmsten Falle zum Tod des Patienten führen. Ursächlich für Neoatherosklerose sind einerseits Veränderungen des Blutflusses, hervorgerufen durch den Metallkäfig des Stents. Andererseits spielen Schädigungen des Endothels durch das von DES freigesetzte Medikament eine Rolle. Sie rufen eine Störung der endothelialen Barrierefunktion hervor, wodurch Cholesterin und Entzündungszellen leichter in subendotheliales Gewebe eindringen können.

Bei der Verwendung vollständig bioresorbierbaren Devices kann sich Vasomotion wieder ausbilden und das Endothel regenerieren, weshalb man sich von dieser Technologie positive Effekte auf die Neoatherosklerose-Entstehung erhofft. Da diesbezügliche Studien in Humanpatienten noch eine Weile auf sich warten lassen werden, wurde im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ein neoatherosklerotisches Kaninchenmodell entwickelt. Dieses wurde nun verwendet, um den ersten zugelassenen Magnesium-BRS auf seine Fähigkeit, Neoatherosklerose zu verhindern, zu untersuchen. Dazu wurde er mit einem permanenten DES mit identischem Design verglichen. In zwei Untergruppen wurde zusätzlich die Wirkung von Atorvastatin auf die Neoatherosklerose einem Placebo gegenübergestellt.

Die gestenteten Arterien wurden mittels OCT-Bildgebung und Histopathologie untersucht, wobei zwei separate Scoring-Systeme eingesetzt wurden, um die Ausprägung der Neoatherosklerose zu beurteilen.

Bei der Beurteilung der lokalen Therapie zeigte sich sowohl im OCT-Neoatherosklerose-Score als auch im Histologie-Neoatherosklerose-Score eine signifikant geringere Infiltration von Schaumzellen in die Neointima des BRS. Die Ergebnisse der Sekundärprävention mittels Statin fielen nicht eindeutig aus. In der Histologie wurde eine signifikant geringere Infiltration von Schaumzellen unter Statinbehandlung beobachtet. In den OCT-frames konnte jedoch kein Unterschied zwischen der Statin- und der Placebogruppe nachgewiesen werden. Der vorzeitige Abbruch der Atorvastatin-Therapie kann vermutlich für dieses uneindeutige Ergebnis verantwortlich gemacht werden.

Das gute Abschneiden des untersuchten BRS im Hinblick auf die Neoatherosklerose-Ausprägung ist ein positives Signal für diese neue Technologie, auch wenn vom Tierversuch nicht unmittelbar auf die Zustände im Humanpatienten geschlossen werden kann. Die deutlich schnellere Ausbildung eines gesunden Endothels, wie sie im Magmaris® in einer nachträglich gestarteten Kaninchengruppe mittels SEM beobachtet wurde, wird für diesen Effekt des BRS verantwortlich gemacht. Hohe Restenoseraten durch prominente Neointimaproliferation im vorgestellten Tierversuch zeigen jedoch, dass weitere Verbesserungen des Stents und ein noch genaueres Verständnis der Heilungs- und Resorptionsvorgänge nötig sind. Weitere Tierstudien mit dem Augenmerk auf ergänzenden und weiterführenden Fragestellungen erscheinen als sinnvolles Gegenstück zu humanen Studien.

VIII SUMMARY

Neoatherosclerosis is defined as the formation of plaque within the neointima of an implanted stent. Neoatherosclerotic changes have been observed in both BMS and DES and can lead to myocardial infarction and ultimately death. Usage of permanent metallic stents alters blood flow in the stented segment which is seen as a possible cause of neoatherosclerosis. Additionally, in DES the eluted drug causes damage to the endothelial barrier resulting in increased permeability for cholesterol and inflammatory cells, thus contributing to accelerated neoatherosclerosis formation in subendothelial tissue.

Restoration of vasomotion is feasible in the presence of rapid re-endothelialization, which is why positive effects of BRS on neoatherosclerosis are expected. As studies in humans are not expected at this point of time our research group developed a rabbit model of neoatherosclerosis. This model was now applied to test the first CE mark approved magnesium-based BRS and its ability to inhibit neoatherosclerosis. For this aim the scaffold was compared to a permanent drug-eluting stent of identical design. Furthermore, in two experimental subgroups the effect of atorvastatin on neoatherosclerosis was studied in comparison to placebo.

Stented arteries were analysed by OCT and histopathology. Neoatherosclerotic changes were evaluated with two dedicated scoring systems.

Evaluation of the effects of secondary prevention showed consistent results in both OCT and histology neoatherosclerosis scores with a statistically significant reduction of foamy macrophage infiltration into BRS neointima. Results of secondary prevention with systemic therapy were unclear. In histopathology, use of statins led to significantly lower foam cell infiltrations. In OCT, however no difference in neoatherosclerosis was observed between rabbits in statin- and placebo-group. This inconclusive result can probably be attributed to premature termination of statin therapy.

The good results of the evaluated BRS in respect of neoatherosclerotic changes are a positive signal for the emerging scaffold technology, even though one cannot extrapolate data attained in animal models to human patients. Reason for this positive effect of the BRS seems to be advanced formation of a healthy endothelium in the scaffolded segment, an observation that

was made in a subgroup started to evaluate endothelialization via SEM. In view of high restenosis rates caused by prominent neointima proliferation device improvements and an advanced understanding of healing and resorption of biodegradable scaffolds are needed. Results obtained from sophisticated, well conducted animal models will help understand the (patho-)physiological mechanisms behind scaffold degradation and will therefore enable further advances in this field of research.

IX LITERATURVERZEICHNIS

1. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016: European Society of Cardiology, 2016.
2. Robert Koch-Institut (RKI). Gesundheit in Deutschland 2015, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Gemeinsam getragen von RKI und Destatis, 2015.
3. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. Brüssel, 2017.
4. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update, A report from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131:e29-322.
5. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 1987;316:701–6.
6. Iqbal J, Gunn J, Serruys PW. Coronary stents: historical development, current status and future directions. *Br Med Bull* 2013;106:193–211.
7. Collet CA, Costa JR, Abizaid A, et al. Assessing the Temporal Course of Neointimal Hyperplasia Formation After Different Generations of Drug-Eluting Stents. *JACC: Cardiovascular Interventions* 2011;4:1067–74.
8. Leopold JA. Neoatherosclerosis: another consequence of endothelial dysfunction? *Circ Cardiovasc Interv* 2014;7:635–7.
9. Vergallo R, Yonetsu T, Uemura S, et al. Correlation between degree of neointimal hyperplasia and incidence and characteristics of neoatherosclerosis as assessed by optical coherence tomography. *Am J Cardiol* 2013;112:1315–21.
10. Gielen S, Haude M, Tebbe U, Frantz S. Moderne Koronarstents und „vascular scaffolds“. *Z Herz- Thorax- Gefäßchir* 2016;(Ausgabe 2/2016).

11. Aumüller G, Aust G, Engele J, et al. Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014. ISBN: 9783131360434.
12. Schiebler TH, Korf H-W. Anatomie. Heidelberg: Steinkopff, 2007. ISBN: 978-3-7985-1770-7.
13. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem, PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2014. ISBN: 9783131395245.
14. Hossler FE. Ultrastructure Atlas of Human Tissues. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; Wiley, 2014. ISBN: 9781118284537.
15. Welsch U. Lehrbuch Histologie, Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie: mit 823 Abbildungen und 21 Tabellen. 2nd ed. München: Elsevier Urban & Fischer, 2006. ISBN: 978-3437424212.
16. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al. A Definition of the Intima of Human Arteries and of Its Atherosclerosis-Prone Regions, A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* (1). January 1992;391–405.
17. Eelen G, Zeeuw P de, Simons M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation Research* 2015;116:1231–44.
18. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases, Life style intervention. *Biomed Res Int* 2014;2014:801896.
19. Gimbrone MA, García-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 2013;22:9–15.
20. Wrapp JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. *Microcirculation* 2014;21:290–300.
21. Aird WC. Endothelium and haemostasis. *Hamostaseologie* 2015;35:11–6.

-
22. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions, From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17:564–80.
 23. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013;9:1057–69.
 24. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:803–15.
 25. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, et al. Endothelial Cell E- and P-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Function as Signaling Receptors. *J Cell Biol* 1998;142:1381–91.
 26. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2014;237:208–19.
 27. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27–32.
 28. Bonetti PO. Endothelial Dysfunction, A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002;23:168–75.
 29. World Health Organization. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. Geneva: World Health Organization, 2011. ISBN: 9789241564373.
 30. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis, The ASTEROID trial. *JAMA* 2006;295:1556–65.
 31. Reiner Z, Catapano AL, Backer G de, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias, The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;32:1769–818.
 32. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease, An update. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1731–7.

33. Kojda G. Interactions between NO and reactive oxygen species, Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;43:562–71.
34. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999;340:115–26.
35. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis., A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462–78.
36. Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC. Arterial Wall Shear and Distribution of Early Atheroma in Man. *Nature* 1969;223:1159–60.
37. Abe J-i, Berk BC. Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2014;34:2378–86.
38. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 1988;112:1018–31.
39. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233–41.
40. Yuan Y, Li P, Ye J. Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis. *Protein Cell* 2012;3:173–81.
41. Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2008;78:8–17.
42. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002;110:905–11.
43. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis, A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355–74.

-
44. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868–74.
 45. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008;28:812–9.
 46. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons From Sudden Coronary Death, A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000;20:1262–75.
 47. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371–5.
 48. Galis SZ, Khatri JJ. Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis, The Good, the Bad, and the Ugly. *Circulation Research* 2002;90:251–62.
 49. Corti R, Farkouh ME, Badimon JJ. The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *The American Journal of Medicine* 2002;113:668–80.
 50. Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC. Vascular remodeling, Hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007;27:1722–8.
 51. Kharlamov AN. New Revolution in Vascular Interventional Medicine, Bioresorbable Scaffolds for Atheroregression. *J Vasc Med Surg* 2013;1.
 52. Myoishi M, Hao H, Minamino T, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 2007;116:1226–33.
 53. Otsuka F, Kramer MCA, Woudstra P, et al. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis* 2015;241:772–82.
 54. Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther* 2016;6:396–408.

- 55.** Essential Cardiology, Principles and Practice. Totowa, NJ: Humana Press Inc, 2006. ISBN: 978-1-58829-370-1.
- 56.** Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316–25.
- 57.** Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens, A. P. J. J., et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions, Relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1517–27.
- 58.** Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The Impact of Calcification on the Biomechanical Stability of Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 2001;103:1051–6.
- 59.** Erdmann E. Klinische Kardiologie, Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 8th ed. Heidelberg: Springer Verlag, 2011. ISBN: 978-3-642-16480-4.
- 60.** Roffi M, Patrono C, Collet J-P, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;37:267–315.
- 61.** Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2013;34:2949–3003.
- 62.** Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012;33:2569–619.
- 63.** Serruys PW, Morice M-C, Kappetein AP, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med* 2009;360:961–72.

-
- 64.** Critchley J, Capewell S. Smoking cessation for the secondary prevention of coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(1):CD003041.
- 65.** Dangas GD, Di Mario C, Kipshidze NN, Barlis P, Addo T, Serruys PW. *Interventional Cardiology, Principles and Practice*. 2nd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. ISBN: 9781118976036.
- 66.** Bonzel T, Hammer CW. *Leitfaden Herzkatheter*. Heidelberg: Steinkopff, 2009. ISBN: 978-3-7985-1880-3.
- 67.** 29. Deutscher Herzbericht 2017, Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland, 2017.
- 68.** Debus ES, Gross-Fengels W. *Operative und interventionelle Gefäßmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. ISBN: 978-3-642-01708-7.
- 69.** Serruys PW, Jaegere P de, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 1994;331:489–95.
- 70.** Fischman DL, Leon MB, Baim DS, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 1994;331:496–501.
- 71.** Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, et al. Sustained Suppression of Neointimal Proliferation by Sirolimus-Eluting Stents, One-Year Angiographic and Intravascular Ultrasound Follow-Up. *Circulation* 2001;104:2007–11.
- 72.** Foin N, Lee RD, Torii R, et al. Impact of stent strut design in metallic stents and biodegradable scaffolds. *Int J Cardiol* 2014;177:800–8.
- 73.** Byrne RA, Iijima R, Mehilli J, et al. Durability of Antirestenotic Efficacy in Drug-Eluting Stents With and Without Permanent Polymer. *JACC: Cardiovascular Interventions* 2009;2:291–9.

- 74.** Nakazawa G, Finn AV, Vorpahl M, Ladich ER, Kolodgie FD, Virmani R. Coronary Responses and Differential Mechanisms of Late Stent Thrombosis Attributed to First-Generation Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:390–8.
- 75.** Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, et al. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1314–22.
- 76.** Lüscher TF, Steffel J, Eberli FR, et al. Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2007;115:1051–8.
- 77.** Otsuka F, Byrne RA, Yahagi K, et al. Neoatherosclerosis, Overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *Eur Heart J* 2015;36:2147–59.
- 78.** Ormiston JA, Serruys PWS. Bioabsorbable coronary stents. *Circ Cardiovasc Interv* 2009;2:255–60.
- 79.** Wykrzykowska JJ, Onuma Y, Serruys PW. Vascular restoration therapy, The fourth revolution in interventional cardiology and the ultimate "rosy" prophecy. *EuroIntervention* 2009;5 Suppl F:F7-8.
- 80.** Onuma Y, Serruys PW. Bioresorbable scaffold, The advent of a new era in percutaneous coronary and peripheral revascularization? *Circulation* 2011;123:779–97.
- 81.** Rapetto C, Leoncini M. Magmaris: A new generation metallic sirolimus-eluting fully bioresorbable scaffold: present status and future perspectives. *J. Thorac. Dis.* 2017;9:S903-S913.
- 82.** Fajadet J, Haude M, Joner M, et al. Magmaris preliminary recommendation upon commercial launch, A consensus from the expert panel on 14 April 2016. *EuroIntervention* 2016;12:828–33.
- 83.** Joner M, Ruppelt P, Zumstein P, et al. Preclinical Evaluation of Degradation Kinetics and Elemental Mapping of First and Second Generation Bioresorbable Magnesium Scaffolds. *EuroIntervention* 2018.

-
- 84.** Serruys PW, Ormiston JA, Onuma Y, et al. A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system (ABSORB), 2-year outcomes and results from multiple imaging methods. *The Lancet* 2009;373:897–910.
- 85.** Ellis SG, Kereiakes DJ, Metzger DC, et al. Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffolds for Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2015;373:1905–15.
- 86.** Puricel S, Arroyo D, Corpataux N, et al. Comparison of everolimus- and biolimus-eluting coronary stents with everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds. *J Am Coll Cardiol* 2015;65:791–801.
- 87.** Stone GW, Gao R, Kimura T, et al. 1-year outcomes with the Absorb bioresorbable scaffold in patients with coronary artery disease, A patient-level, pooled meta-analysis. *The Lancet* 2016;387:1277–89.
- 88.** Serruys PW, Chevalier B, Sotomi Y, et al. Comparison of an everolimus-eluting bioresorbable scaffold with an everolimus-eluting metallic stent for the treatment of coronary artery stenosis (ABSORB II), A 3 year, randomised, controlled, single-blind, multicentre clinical trial. *The Lancet* 2016;388:2479–91.
- 89.** Cassese S, Byrne RA, Ndrepepa G, et al. Everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds versus everolimus-eluting metallic stents, A meta-analysis of randomised controlled trials. *The Lancet* 2016;387:537–44.
- 90.** Ali ZA, Gao R, Kimura T, et al. Three-Year Outcomes With the Absorb Bioresorbable Scaffold, Individual-Patient-Data Meta-Analysis From the ABSORB Randomized Trials. *Circulation* 2018;137:464–79.
- 91.** Puricel S, Cuculi F, Weissner M, et al. Bioresorbable Coronary Scaffold Thrombosis, Multicenter Comprehensive Analysis of Clinical Presentation, Mechanisms, and Predictors. *J Am Coll Cardiol* 2016;67:921–31.
- 92.** Yamaji K, Ueki Y, Souteyrand G, et al. Mechanisms of Very Late Bioresorbable Scaffold Thrombosis, The INVEST Registry. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2330–44.

- 93.** Virmani R, Jinnouchi H, Finn AV. Discontinuity, Is it a Major Cause of Scaffold Thrombosis? *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2345–8.
- 94.** Haude M, Ince H, Abizaid A, et al. Safety and performance of the second-generation drug-eluting absorbable metal scaffold in patients with de-novo coronary artery lesions (BIOSOLVE-II), 6 month results of a prospective, multicentre, non-randomised, first-in-man trial. *The Lancet* 2016;387:31–9.
- 95.** Haude M, Ince H, Abizaid A, et al. Sustained safety and performance of the second-generation drug-eluting absorbable metal scaffold in patients with de novo coronary lesions, 12-month clinical results and angiographic findings of the BIOSOLVE-II first-in-man trial. *Eur Heart J* 2016;37:2701–9.
- 96.** Haude M, Ince H, Kische S, et al. Sustained safety and clinical performance of a drug-eluting absorbable metal scaffold up to 24 months, Pooled outcomes of BIOSOLVE-II and BIOSOLVE-III. *EuroIntervention* 2017;13:432–9.
- 97.** Capodanno D. Bioresorbable Scaffolds in Coronary Intervention, Unmet Needs and Evolution. *Korean Circ J* 2018;48:24–35.
- 98.** Horstmann J, Siebelmann S, Schulz-Hildebrandt H, Glasunow I, Schadschneider A, Hüttmann G. OCT verstehen – Teil 2, Praktische Aspekte und Anwendung. *Augenheilkunde up2date* 2016;6:305–20.
- 99.** Nef HM, Boeder NF, Abdel-Wahab M, et al. Empfehlungen zur Anwendung von intravaskulärer Bildgebung (optische Kohärenztomographie). *Kardiologe* 2017;11:300–8.
- 100.** Gaßdorf J. Die OCTOPUS-Studie: Implementierung eines quantitativen Analysealgorithmus für optische Kohärenztomographie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2015.
- 101.** Regar E, Ligthart J, Bruining N, van Soest G. The diagnostic value of intracoronary optical coherence tomography. *Herz* 2011;36:417–29.
- 102.** Manns D. HMG-CoA-Reduktase Hemmer. *Pharmazie in unserer Zeit* 1999;28:147–52.

-
- 103.** Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment, Prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins. *The Lancet* 2005;366:1267–78.
- 104.** Sadowitz B, Maier KG, Gahtan V. Basic science review, Statin therapy--Part I: The pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease. *Vasc Endovascular Surg* 2010;44:241–51.
- 105.** Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacology & Therapeutics* 1999;84:413–28.
- 106.** Kim C, Kim B-K, Lee S-Y, et al. Incidence, clinical presentation, and predictors of early neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation. *American Heart Journal* 2015;170:591–7.
- 107.** Takano M, Yamamoto M, Inami S, et al. Appearance of Lipid-Laden Intima and Neovascularization After Implantation of Bare-Metal Stents // Appearance of lipid-laden intima and neovascularization after implantation of bare-metal stents extended late-phase observation by intracoronary optical coherence tomography, Extended Late-Phase Observation by Intracoronary Optical Coherence Tomography. *J Am Coll Cardiol* 2009;55:26–32.
- 108.** Kang S-J, Mintz GS, Akasaka T, et al. Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation* 2011;123:2954–63.
- 109.** Kang S-J, Song H-G, Ahn J-M, et al. OCT-verified neoatherosclerosis in BMS restenosis at 10 years. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012;5:1267–8.
- 110.** Yonetsu T, Kato K, Kim S-J, et al. Predictors for neoatherosclerosis, A retrospective observational study from the optical coherence tomography registry. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012;5:660–6.

- 111.** Lee S-Y, Hur S-H, Lee S-G, et al. Optical coherence tomographic observation of in-stent neoatherosclerosis in lesions with more than 50% neointimal area stenosis after second-generation drug-eluting stent implantation. *Circ Cardiovasc Interv* 2015;8:e001878.
- 112.** Kuroda M, Otake H, Shinke T, et al. The impact of in-stent neoatherosclerosis on long-term clinical outcomes, An observational study from the Kobe University Hospital optical coherence tomography registry. *EuroIntervention* 2016;12:e1366-e1374.
- 113.** Romero ME, Yahagi K, Kolodgie FD, Virmani R. Neoatherosclerosis From a Pathologist's Point of View. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2015;35:e43–49.
- 114.** Nakazawa G, Vorpahl M, Finn AV, Narula J, Virmani R. One step forward and two steps back with drug-eluting-stents, From preventing restenosis to causing late thrombosis and nouveau atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2009;2:625–8.
- 115.** Cui Y, Liu Y, Zhao F, Shi D, Chen K. Neoatherosclerosis after Drug-Eluting Stent Implantation: Roles and Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:5924234.
- 116.** Serruys PW, Garcia-Garcia HM, Onuma Y. From metallic cages to transient bioresorbable scaffolds, Change in paradigm of coronary revascularization in the upcoming decade? *Eur Heart J* 2012;33:16-25b.
- 117.** Sotomi Y, Onuma Y, Collet C, et al. Bioresorbable Scaffold, The Emerging Reality and Future Directions. *Circulation Research* 2017;120:1341–52.
- 118.** Karanasos A, Simsek C, Gnanadesigan M, et al. OCT assessment of the long-term vascular healing response 5 years after everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2343–56.
- 119.** Hiltrop N, Desmet W, Adriaenssens T, Bennett J. Neoatherosclerosis, An emerging and conceptually unexpected cause of very late bioresorbable vascular scaffold failure. *EuroIntervention* 2017;12:2031.
- 120.** Sato T, Richardt G, Abdel-Wahab M. Early neoatherosclerosis after bioresorbable vascular scaffold implantation, Insights from optical coherence tomography. *Coron Artery Dis* 2016;27:616–7.

-
- 121.** Windecker S, Kolh P, Alfonso F, et al. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization, The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J* 2014;35:2541–619.
- 122.** Siontis GCM, Stefanini GG, Mavridis D, et al. Percutaneous coronary interventional strategies for treatment of in-stent restenosis, A network meta-analysis. *The Lancet* 2015;386:655–64.
- 123.** Alfonso F, Byrne RA, Rivero F, Kastrati A. Current treatment of in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2659–73.
- 124.** Emini Veseli B, Perrotta P, Meyer GRA de, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 2017;816:3–13.
- 125.** Konstantinov IE, Jankovic GM. Alexander I. Ignatowski, A pioneer in the study of atherosclerosis. *Tex Heart Inst J* 2013;40:246–9.
- 126.** Dornas W, Dornas WC, Oliveira TTd, Augusto LEF, Nagem TJ. Experimental Atherosclerosis in Rabbits // Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2010;95:272–8.
- 127.** Overturf ML, Loose-Mitchell DS. In vivo model systems, The choice of the experimental animal model for analysis of lipoproteins and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 1992;3:179–85.
- 128.** Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases* 2014;2:126–32.
- 129.** Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis, From pathophysiological mechanisms to translational medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 2015;146:104–19.
- 130.** Lee YT, Lin HY, Chan YWF, et al. Mouse models of atherosclerosis: A historical perspective and recent advances. *Lipids Health Dis* 2017;16:12.

- 131.** Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man, Is it the same disease? *Current Opinion in Lipidology* 2010;21:434–40.
- 132.** Getz G, Reardon C. Animal Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2012;32:1104–15.
- 133.** Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice, Atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S178-82.
- 134.** Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:503–17.
- 135.** Granada JF, Kaluza GL, Wilensky RL, Biedermann BC, Schwartz RS, Falk E. Porcine models of coronary atherosclerosis and vulnerable plaque for imaging and interventional research. *EuroIntervention* 2009;5:140–8.
- 136.** Hamamdžic D, Wilensky RL. Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis, Role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia. *J Diabetes Res* 2013;2013:761415.
- 137.** Thim T, Hagensen MK, Drouet L, et al. Familial hypercholesterolaemic downsized pig with human-like coronary atherosclerosis, A model for preclinical studies. *EuroIntervention* 2010;6:261–8.
- 138.** Shim J, Al-Mashhadi RH, Sørensen CB, Bentzon JF. Large animal models of atherosclerosis--new tools for persistent problems in cardiovascular medicine. *J Pathol* 2016;238:257–66.
- 139.** van Ditzhuijzen NS, Kurata M, van den Heuvel M, et al. Neoatherosclerosis development following bioresorbable vascular scaffold implantation in diabetic and non-diabetic swine. *PLoS ONE* 2017;12:e0183419.
- 140.** Lane JP, Perkins LEL, Sheehy AJ, et al. Lumen gain and restoration of pulsatility after implantation of a bioresorbable vascular scaffold in porcine coronary arteries. *JACC Cardiovasc Interv* 2014;7:688–95.

-
- 141.** Onuma Y, Serruys PW, Perkins LEL, et al. Intracoronary optical coherence tomography and histology at 1 month and 2, 3, and 4 years after implantation of everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds in a porcine coronary artery model: an attempt to decipher the human optical coherence tomography images in the ABSORB trial. *Circulation* 2010;122:2288–300.
- 142.** Waksman R, Zumstein P, Pritsch M, et al. Second-generation magnesium scaffold Magmaris, Device design and preclinical evaluation in a porcine coronary artery model. *EuroIntervention* 2017;13:440–9.
- 143.** Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CBA, Corcoran BM, Summers KM, MacRae VE. Large animal models of cardiovascular disease. *Cell Biochem Funct* 2016;34:113–32.
- 144.** Prati F, Zimarino M, Stabile E, et al. Does optical coherence tomography identify arterial healing after stenting? An in vivo comparison with histology, in a rabbit carotid model. *Heart* 2008;94:217–21.
- 145.** Yang H, Wang C, Liu C, et al. Evolution of the degradation mechanism of pure zinc stent in the one-year study of rabbit abdominal aorta model. *Biomaterials* 2017;145:92–105.
- 146.** Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:2057–64.
- 147.** Mortensen A. The Use of Rabbits in Atherosclerotic Research. Diet and Drug Intervention in Different Rabbit Models Exposed to Selected Dietary Fats and the Calcium Antagonist Anipamil, Evaluation and Comparison of rabbit models [Dissertation]. Soborg, Denmark: Roskilde University, 1995.
- 148.** McMahon AC, Kritharides L, Lowe HC. Animal models of atherosclerosis progression, Current concepts. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5:433–40.
- 149.** Yanni A. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory Animals* 2004;38:246–56.

- 150.** Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury, Results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267–74.
- 151.** Otsuka F, Vorpahl M, Nakano M, et al. Pathology of second-generation everolimus-eluting stents versus first-generation sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in humans. *Circulation* 2014;129:211–23.
- 152.** Hein J, Hartmann K. Labordiagnostische Referenzbereiche bei Kaninchen. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* 2003;(5):321–8.
- 153.** Ughi GJ, Steigerwald K, Adriaenssens T, et al. Automatic characterization of neointimal tissue by intravascular optical coherence tomography. *J Biomed Opt* 2014;19:021104-1 - 021104-8.
- 154.** Hiltrop N, Jorge C, Bennett J, Adriaenssens T. Late neoatherosclerotic scaffold failure, An unexpected achilles heel for current bioresorbable scaffold technology? *Int J Cardiol* 2016;223:133–5.
- 155.** Koniari I, Apostolakis E, Diamantopoulos A, et al. Transauricular balloon angioplasty in rabbit thoracic aorta, A novel model of experimental restenosis. *Lipids Health Dis* 2014;13:33.
- 156.** Huber H, Pastner D, Gabl F. Hämatologie und Immunhämatologie. Berlin u.a.: Springer, 1983. XXI, 553 S. (Laboratoriumsdiagnose hämatologischer Erkrankungen; vol. 1). ISBN: 9783540117421.
- 157.** Ali SAM, Doherty PJ, Williams DF. Molecular biointeractions of biomedical polymers with extracellular exudate and inflammatory cells and their effects on the biocompatibility, in vivo. *Biomaterials* 1994;15:779–85.
- 158.** Zhang B-C, Karanasos A, Regar E. OCT demonstrating neoatherosclerosis as part of the continuous process of coronary artery disease. *Herz* (6). 2015:845–54.
- 159.** Lee S-Y, Hong M-K, Mintz GS, et al. Temporal course of neointimal hyperplasia following drug-eluting stent implantation, A serial follow-up optical coherence tomography analysis. *Int J Cardiovasc Imaging* 2014;30:1003–11.

160. Borovac JA, D'Amario D, Niccoli G. Neoatherosclerosis and Late Thrombosis After Percutaneous Coronary Intervention: Translational Cardiology and Comparative Medicine from Bench to Bedside. *Yale J Biol Med* 2017;90:463–70.

161. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation, Vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:733–9.

162. Vorpahl M, Nakano M, Perkins LEL, et al. Vascular healing and integration of a fully bioresorbable everolimus-eluting scaffold in a rabbit iliac arterial model. *EuroIntervention* 2014;10:833–41.

X ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gefäßaufbau.....	5
Abbildung 2: Endothel in „Atherosklerose-resistenten“ und „-anfälligen“ Gefäßen	11
Abbildung 3: Lipoproteinprofil von Mensch und Kaninchen.....	39
Abbildung 4: Gruppen bei der Entwicklung des neoatherosklerotischen Tiermodells.....	40
Abbildung 5: Verwendeter BRS und DES	50
Abbildung 6: Studienaufbau	52
Abbildung 7: Blutentnahmen	54
Abbildung 8: Präparation der Arteria carotis	58
Abbildung 9: Einbringen der Gefäßschleuse	59
Abbildung 10: Initiales Angiogramm	60
Abbildung 11: Vorgang der Stentimplantation.....	62
Abbildung 12: Zustand nach beidseitiger Stentimplantation.....	63
Abbildung 13: Vorbereitung des OCT-Katheters	67
Abbildung 14: Gefäßpräparation nach Perfusionsfixation mit Formalin.....	69
Abbildung 15: Überblick über die Positionen der histologischen Querschnitte	70
Abbildung 16: VVG-gefärbte Gefäßquerschnitte ohne und mit Morphometrie-Messungen	73
Abbildung 17: Entwicklung des Kaninchengewichts über den Versuchszeitraum	79
Abbildung 18: Verlauf des Serumcholesterinspiegels über den Versuchszeitraum.....	80

Abbildung 19: Serumcholesterinspiegel der drei Versuchsgruppen dargestellt als AUC.....	81
Abbildung 20: Ergebnisse des OCT-Neoatherosklerose-Scores.....	91
Abbildung 21: Neointimafläche und % Stenose in BRS und DES.....	93
Abbildung 22: Finale Angiografie-Aufnahmen	94
Abbildung 23: HE- und VVG-gefärbte Gefäßquerschnitte	95
Abbildung 24: Schaumzellinfiltration in der Histologie	97
Abbildung 25: Ergebnisse des Histologie-Neoatherosklerose-Scores	98
Abbildung 26: Überblick über typische Befunde der Histologie	99
Abbildung 27: Nach der Stentimplantation erstellte Angiografie-Aufnahmen.....	107

XI TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Prävalenz von Neoatherosklerose.....	29
Tabelle 2: Vor- und Nachteile der wichtigsten Versuchstiere in der (neo-)atherosklerotischen Forschung	34
Tabelle 3: Histologie-Neoatherosklerose-Score	77
Tabelle 4: Morphometrie-Ergebnisse ermittelt in den OCT- <i>pullbacks</i> nach 91 Tagen	84
Tabelle 5: Ergebnisse des OCT-Neoatherosklerose-Scores nach 91 Tagen.....	85
Tabelle 6: Histologie-Morphometrie-Ergebnisse nach 91 Tagen.....	86
Tabelle 7: Semi-quantitative Auswertung in der Histologie nach 91 Tagen	87
Tabelle 8: Ergebnisse des Histologie-Neoatherosklerose-Scores nach 91 Tagen	88
Tabelle 9: Ergebnisse der morphometrischen Messungen in der OCT nach 161 Tagen	89
Tabelle 10: Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scorings in der OCT nach 161 Tagen	90
Tabelle 11: Histologie-Morphometrie-Ergebnisse nach 161 Tagen.....	92
Tabelle 12: Semi-quantitative Evaluierung der histologischen Schnitte nach 161 Tagen	96
Tabelle 13: Ergebnisse des Neoatherosklerose-Scorings in der Histologie nach 161 Tagen	98

XII ANHANG

1 Anhang 1: 1%iges Cholesterinfutter

Cholesterindiätfuttermittel für Kaninchen mit 1% Cholesterin, 6% Erdnussöl von Altromin Spezialfuttermittel GmbH

Inhaltsstoff	Bedarf	Einheit	Inhaltsstoff	Bedarf	Einheit
Rohprotein	182.479,68	mg/kg	Nikotinsäure	36,00	mg/kg
Rohfett	92.535,60	mg/kg	Pantothenäure	21,00	mg/kg
Rohfaser	132.374,15	mg/kg	Folsäure	3,19	mg/kg
Rohasche	61.699,98	mg/kg	Biotin	0,43	mg/kg
Feuchtigkeit	94.438,53	mg/kg	Cholinchlorid	784,00	mg/kg
Disaccharide	64.772,21	mg/kg	Vitamin C	36,00	mg/kg
Polysaccharide	292.163,67	mg/kg	Calcium	8.101,54	mg/kg
Umsetzb.Energie	3.203,94	kcal/kg	Ges.Phosphor	6.163,31	mg/kg
Lysin	7.787,21	mg/kg	Verd.Phosphor	3.905,33	mg/kg
Methionin	2.363,33	mg/kg	Magnesium	1.623,55	mg/kg
Cystin	2.339,25	mg/kg	Natrium	2.736,93	mg/kg
Threonin	6.291,50	mg/kg	Kalium	7.057,57	mg/kg
Tryptophan	2.268,75	mg/kg	Schwefel	1.494,71	mg/kg
Arginin	12.002,50	mg/kg	Chlor	3.800,95	mg/kg
Histidin	4.233,75	mg/kg	Eisen	160,83	mg/kg
Isoleucin	7.396,00	mg/kg	Mangan	41,55	mg/kg
Leucin	12.634,75	mg/kg	Zink	48,87	mg/kg
Phenylalanin	7.458,50	mg/kg	Kupfer	11,78	mg/kg
Valin	7.272,75	mg/kg	Jod	1,27	mg/kg
Alanin	8.334,50	mg/kg	Molybdän	0,65	mg/kg
Asparaginsäure	17.098,25	mg/kg	Fluor	7,15	mg/kg
Glutaminsäure	34.858,00	mg/kg	Selen	0,40	mg/kg
Glycin	7.155,75	mg/kg	Kobalt	0,37	mg/kg
Prolin	9.386,25	mg/kg	Palmitinsäure C-16:0	6.345,00	mg/kg
Serin	8.396,50	mg/kg	Stearinsäure C-18:0	2.280,00	mg/kg
Tyrosin	5.793,50	mg/kg	Ölsäure C-18:1	36.015,00	mg/kg
Vitamin A	15.000,00	I.E./kg	Linolsäure C-18:2	21.322,50	mg/kg
Vitamin D3	600,00	I.E./kg	Linolensäure C-18:3	787,50	mg/kg
Vitamin E	75,00	mg/kg	Arachinsäure C-20:0	1.440,00	mg/kg
Vitamin K3	3,00	mg/kg	Behensäure C-22:0	1.860,00	mg/kg
Vitamin B1	18,00	mg/kg	Lignocerinsäure C-24:0	660,00	mg/kg
Vitamin B2	12,00	mg/kg	Canthaxanthin	17,25	mg/kg
Vitamin B6	9,00	mg/kg	Cholesterin	10.000,65	mg/kg
Vitamin B12	0,02	mg/kg	B-Apo-8-Carotinsäure	23,00	mg/kg
			Aluminium	188,22	mg/kg

2 Anhang 2: 0,025%iges Cholesterinfutter

Cholesterindiätfuttermittel für Kaninchen mit 0,025% Cholesterin, 6% Erdnussöl von Altromin Spezialfutter GmbH

Inhaltsstoff	Gehalt	Einheit	Inhaltsstoff	Gehalt	Einheit
Rohprotein	182.479,68	mg/kg	Nikotinsäure	36,00	mg/kg
Rohfett	84.530,46	mg/kg	Pantothensäure	21,00	mg/kg
Rohfaser	132.374,15	mg/kg	Folsäure	3,19	mg/kg
Rohasche	61.710,24	mg/kg	Biotin	0,43	mg/kg
Feuchtigkeit	94.674,58	mg/kg	Cholinchlorid	784,00	mg/kg
Disaccharide	74.829,95	mg/kg	Vitamin C	36,00	mg/kg
Polysaccharide	292.163,67	mg/kg	Calcium	8.104,10	mg/kg
Umsetzb.Energie	3.172,08	kcal/kg	Ges.Phosphor	6.165,36	mg/kg
Lysin	7.787,21	mg/kg	Verd.Phosphor	3.907,38	mg/kg
Methionin	2.363,33	mg/kg	Magnesium	1.624,27	mg/kg
Cystin	2.339,25	mg/kg	Natrium	2.738,01	mg/kg
Threonin	6.291,50	mg/kg	Kalium	7.058,59	mg/kg
Tryptophan	2.268,75	mg/kg	Schwefel	1.494,71	mg/kg
Arginin	12.002,50	mg/kg	Chlor	3.800,95	mg/kg
Histidin	4.233,75	mg/kg	Eisen	160,84	mg/kg
Isoleucin	7.396,00	mg/kg	Mangan	41,55	mg/kg
Leucin	12.634,75	mg/kg	Zink	48,89	mg/kg
Phenylalanin	7.458,50	mg/kg	Kupfer	11,78	mg/kg
Valin	7.272,75	mg/kg	Jod	1,27	mg/kg
Alanin	8.334,50	mg/kg	Molybdän	0,65	mg/kg
Asparaginsäure	17.098,25	mg/kg	Fluor	7,15	mg/kg
Glutaminsäure	34.858,00	mg/kg	Selen	0,40	mg/kg
Glycin	7.155,75	mg/kg	Kobalt	0,37	mg/kg
Prolin	9.386,25	mg/kg	Palmitinsäure C-16:0	6.345,00	mg/kg
Serin	8.396,50	mg/kg	Stearinsäure C-18:0	2.280,00	mg/kg
Tyrosin	5.793,50	mg/kg	Ölsäure C-18:1	36.015,00	mg/kg
Vitamin A	15.000,00	I.E./kg	Linolsäure C-18:2	21.322,50	mg/kg
Vitamin D3	600,00	I.E./kg	Linolensäure C-18:3	787,50	mg/kg
Vitamin E	75,00	mg/kg	Arachinsäure C-20:0	1.440,00	mg/kg
Vitamin K3	3,00	mg/kg	Behensäure C-22:0	1.860,00	mg/kg
Vitamin B1	18,00	mg/kg	Lignocerinsäure C-24:0	660,00	mg/kg
Vitamin B2	12,00	mg/kg	Canthaxanthin	17,25	mg/kg
Vitamin B6	9,00	mg/kg	Cholesterin	250,80	mg/kg
Vitamin B12	0,02	mg/kg	B-Apo-8-Carotinsäure	23,00	mg/kg
			Aluminium	188,24	mg/kg

3 Anhang 3: Aufzeichnungsplan Tierversuch

Aufzeichnungsplan TVA „Untersuchungen zu Entstehungsmechanismen und Therapieansätzen sowie Evaluierung neuartiger bildgebender Detektionsverfahren bei Neoatherosklerose am Kaninchenmodell“

Identifikationsnummer (Ohrtätowierung): _____

Herkunft des Tieres: _____

Datum Ankunft des Tieres: _____

Tier Studien-ID: _____

Projekt-AZ: _____

Unterschrift Projektleiter oder Stellvertreter: _____

Tierart/ Alter/Gewicht der Tiere	Gruppe: (Stent-Typ: DES/BRS)	Datum Beginn Diät	Datum Euthanasie
NZW Kaninchen Gewicht Ankunft: Geschlecht: männl.	LIA: RIA:		
	1. Denudation + Stent-implantation:		
	Datum:		
OP/Narkose- Verlauf			
Post operatives Befinden (innerhalb 2 Stunden)			
Post operative Analgesie (Art, Zeitraum, Dosierung)			
Probennahme nach Euthanasie			
Sonstiges			

Score Sheet zur Bewertung der auftretenden post operativen Belastung zum TVA „Untersuchungen zu Entstehungsmechanismen und Therapieansätzen sowie Evaluierung neuartiger bildgebender Detektionsverfahren bei Neoatherosklerose am Kaninchenmodell“

Projektleiter: PD Dr. Baumgartner

Animal ID:	Datum Versuchsbeginn:			Datum 1. Denudation + Stentimplantation:			Datum 2. Denudation:					
Gruppe:												
Projekt-AZ:												
Untersucher:	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	Datum	
Allgemein körperlicher Zustand												
Körpergewicht (0=Gewichtsverlust <5%; 1=Gewichtsverlust 5 bis ≤10%; 2=Gewichtsverlust >10 bis ≤15%; 3 =Gewichtsverlust >15%)												
Futeraufnahme (0=ja, Menge physiologisch; 1=reduziert; 2=keine)												
Tränkeaufnahme (0=ja, Menge physiologisch; 1=reduziert; 2=keine)												
Kotabsatz (0=vorhanden; 1=wenig; 2=kein)												
Harnabsatz (0=vorhanden; 2=kein)												
Aktivität (0=aktiv; 1=wenig aktiv; 2=inaktiv)												

Lahmheit der Hintergliedmaßen (0= keine Lahmheit; 3 = Lahmheit)										
Adspektion/Palpation des Halses (0= normal Wundheilung; 1 = leichtes Hämatom; 2 = mittelgradiges Hämatom/Schwellung oder verzögerte Wundheilung verbunden mit Schmerzen; 3 = hochgradiges Hämatom oder starke Wundheilungsstörung verbunden mit starken Schmerzen)										

Anmerkung zur Beurteilung: Das Opioid-Analgetikum Buprenorphin kann so sedierend wirken, dass das Allgemeinzustand und Kotabsatz in dieser Wirkdauer etwas reduziert sein kann.

Kontrollrhythmus:

VOR dem Eingriff: alle 3 Tage

NACH dem Eingriff (Tag 7 bzw. Tag 63): 7 Tage nach OP täglich; danach alle 3 Tage

Einteilung der Belastung nach Erreichen eines Scores von:

Score 0: keine Belastung
Score 1: geringe Belastung → Tier bleibt im Versuch, Score-Frequenz mind. 1x täglich

Score 2: mäßige Belastung → Abklärung der Ursache durch tierärztliche Untersuchung; ggf. symptomatische Behandlung wie z.B. Schmerzbehandlung, Antibiose etc.
→ erneute Evaluierung des Score-Protokolls ca. 2 Std. nach erfolgter Behandlung
→ wenn keine Besserung der Symptome, Abbruch je nach Symptomatik nach spätestens 2 Tagen

Score 3: starke Belastung → Abbruch des Versuchs

Humaner Endpunkt, sofortiger Abbruch mit Euthanasie des Tieres:

- Score-Wert von 2 über 2 Tage

6 Anhang 6: OP-Protokoll

Datum	Tierart	Geschlecht	KGW	Projekt-Nr.	Tiernummer	Durchführender
	Kaninchen	männlich				
Zeit						
Katheterintervention						
HF						
SpO2						
EtCO2						
AF						
Peak (cm H2O)						
l.v.-Zugang Ohrvene						
Intubation						
Präp - A. carotis communis						
Angiographie						
Denudation						
Implantation Stent						
Ligation A. carotis communis						
Medikamente:						
Propofol 1% (ml)						
Propofol 2% (ml/h)						
Heparin (150 I.E./kg)						
Kontrastmittel						
Fentanyl (ml)						
Enrofloxacin (10 mg/kg) s.c.						
Buprenorphin (0,01 mg/kg) s.c.						
Bemerkungen:						

7 Anhang 7: Implantationsmatrix

Tier-ID	LIA (linke Iliacalarterie)	RIA (rechte Iliacalarterie)
#1	BRS	DES
#2	DES	BRS
#3	BRS	DES
#4	DES	BRS
#5	BRS	DES
#6	DES	BRS
#7	BRS	DES
#8	DES	BRS
#9	BRS	DES
#10	DES	BRS
#11	BRS	DES
#12	DES	BRS
#13	BRS	DES
#14	DES	BRS
#15	BRS	DES
#16	DES	BRS
#17	BRS	DES
#18	DES	BRS
#19	BRS	DES
#20	DES	BRS
#21	BRS	DES
#22	DES	BRS
#23	BRS	DES
#24	DES	BRS
#25	BRS	DES
#26	DES	BRS
#27	BRS	DES
#28	DES	BRS
#29	BRS	DES
#30	DES	BRS
#31	BRS	DES
#32	DES	BRS
#33	BRS	DES
#34	DES	BRS
#35	BRS	DES
#36	DES	BRS
#37	BRS	DES
#38	DES	BRS
#39	BRS	DES
#40	DES	BRS

8 Anhang 8: Blutwerte

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Blutuntersuchungen aller Kaninchen. Das Leberprofil (ALT, AST, Cholesterin, gamma-GT, SGS, GLDH) wurde von SYNLAB Ausburg aus eingesandtem Serum erstellt. Das kleine Blutbild wurde mit einem Poch-Blutuntersuchungsgerät (Poch-100 iV Diff, Automated Hematology Analyzier, Sysmex Corporation, Kobe, Japan) aus EDTA-Blut ermittelt.

Bei Abweichungen von den Referenzwerten (vgl. erste Zeile) symbolisiert ein (+) hinter dem Wert einen zu hohen, ein (–) einen zu niedrigen Spiegel des Parameters.

Referenzwerte	0 - 61 U/l	< 28 U/l	0,31 - 2,66 mmol/l	0-13 U/l	0 - 77,6 umol/l	0 - 19 U/l	6 - 12 G/l	4 - 7 T/l	8 - 15 g/dl	30 - 50 %	59 - 75 fl	19,5 - 24,7 pg	31,3 - 34,8 g/dl	115 - 940 G/l
Tag der Blutentnahme	ALT	AST	Cholesterin	γ-GT	SGS	GLDH	Leukozyten	Erythrozyten	Hb	Hkt	MCV	MCH	MCHC	Thrombozyten
Kaninchen 1														
Tag -1	36 (-)	18	1,78	6	8,2	3	10	7,7 (+)	16,0 (+)	49	64	20,9	32,8	329
Tag 7	33	37 (+)	27,76 (+)	< 5	43,5	2,1	10	6,19	12,8	38,6	62,4	20,7	33,2 (+)	424
Tag 35	36	44 (+)	38,88 (+)	6	71,5	7,6	9,2	5,65	12,4	37,2	65,8	21,9	33,3 (+)	338
Tag 63	35	30 (+)	17,64 (+)	< 5	50,3	3,8	11,3	6,21	13,6	41	66	21,9	33,2 (+)	328
Tag 91	Verstorben an Tag 65													
Kaninchen 2														
Tag -1	38 (-)	23	2,89 (+)	5	9	4	5,2 (-)	7,7 (+)	15,6 (+)	48	62	20,2	32,6	370
Tag 7	67 (+)	204 (+)	36,13 (+)	8	67,1	196,9 (+)	9,5	6,92	13,3	41,8	60,4	19,2	31,8	389
Tag 35	70 (+)	51 (+)	72 (+)	8	95,8 (+)	6,4	9,6	5,32 (-)	11,5	34,2 (-)	64,3	21,6	33,6 (+)	373
Tag 63	33	30 (+)	12,61 (+)	< 5	17,5	3	7,2	5,77	11,6	36,2	62,7	20,1	32	419
Tag 91	44	28	17,90 (+)	5	17	5,9	9,6	6,86	13,5	42	61,2	19,7	32,1 (+)	450
Tag 126	42	33 (+)	14,04 (+)	8	35	9,5	8,5	6,5	13,9	45,4	69,8	21,4	30,6	576
Tag 161	22	18	2,23	< 5	5,3	< 2	4,1	6,01	12,1	37,4	62,2	20,1	32,4 (+)	415
Kaninchen 3														
Tag -1	48	24	1,94	6	11,9	4	7,7	7,4 (+)	15,8 (+)	51 (+)	69	21,4	31,2	181
Tag 7	36	15	8,21 (+)	8	29,9	2,3	9	6,24	12,9	42,5	68,1	20,7	30,4	364
Tag 35	48	29 (+)	45,12 (+)	6	64,8	< 2	15,2 (+)	5,58	12,9	38,8	69,5	23,1 (+)	33,2 (+)	263
Tag 63	29	29 (+)	6,32 (+)	5	10,6	2,5	9,8	6,9	15,2	49,8	72,2 (+)	22	30,5	239
Tag 91	Euthanasiert wegen neurologischen Symptomen an Tag 64													
Kaninchen 4														
Tag -1	36 (-)	27	1,94	8	15,7	6	6,7	7,5 (+)	15,5 (+)	50	67	20,7	30,8 (-)	227
Tag 7	42	56 (+)	31,13 (+)	7	30	3,4	9,5	6,64	13,9	42,8	64,5	20,9	32,5 (+)	414
Tag 35	32	36 (+)	52,81 (+)	7	47,1	7,2	8	5,42	12,1	38,1	70,3 (+)	22,3 (+)	31,8	270
Tag 63	25	49 (+)	10,88 (+)	< 5	6,8	3,2	7	5,86	12,9	41,3	70,5 (+)	22	31,2	312
Tag 91	30	42 (+)	8,73 (+)	< 5	13,5	4,1	5,8	6,95	15,1	46,4	66,8	21,7	32,5 (+)	330
Tag 126	39	46 (+)	8,91 (+)	7	8,1	4,6	8,1	6,49	14,6	44,4	68,4	22,5 (+)	32,9 (+)	421
Tag 161	23	25	0,98	< 5	9,4	< 2	5,3	5,55	12,3	37,1	66,8	22,2 (+)	33,2 (+)	297

Tag der Blutentnahme	ALT	AST	Cholesterin	γ-GT	SGS	GLDH	Leukozyten	Erythrozyten	Hb	Hkt	MCV	MCH	MCHC	Thrombozyten
Kaninchen 11														
Tag -1	29 (-)	15	1,55	8	25 (++)	3	7,3	7,1 (+)	15,6 (+)	51 (+)	73	22,1	30,5 (-)	276
Tag 7	36	31 (+)	23,05 (+)	11	21,6	< 2	10,8	7,24	15	49,8	68,8	20,7	30,1	268
Tag 35	98 (+)	63 (+)	33,02 (+)	8	44,8	9,7	8,8	5,62	12,8	38,6	68,7	22,8 (+)	33,2 (+)	301
Tag 63	38	28	29,22 (+)	8	24,7	2,7	8,9	6,12	13,6	41,7	68,1	22,2 (+)	32,6 (+)	453
Tag 91	26	22	39,19 (+)	12	94,7 (+)	2,2	11	5,91	13,1	41,7	70,6 (+)	22,2 (+)	31,4	430
Tag 126	24	18	9,35 (+)	10	26,3	2,1	11,7	5,92	13,6	42,9	72,5 (+)	23,0 (+)	31,7	470
Tag 161	21	16	0,91	5	26,4	< 2	4,1	5,64	12,9	40,3	71,5 (+)	22,9 (+)	32	412
Kaninchen 12														
Tag -1	35 (-)	20	2,44	6	17,1	4	7,2	6,8	13,5	43	64	20,0	31,4	273
Tag 7	39	61 (+)	26,68 (+)	7	16,5	5,8	10,8	6,83	13,3	41,9	61,3	19,5	31,7	327
Tag 35	96 (+)	102 (+)	54,55 (+)	9	78,5 (+)	15,7	11	5,9	12,3	36,7	62,2	20,8	33,5 (+)	320
Tag 63	29	24	22,25 (+)	6	12,8	2,5	7,3	5,41	10,9 (-)	34,2 (-)	63,2	20,1	31,9	302
Tag 91	26	30 (+)	26,75 (+)	8	66	4,3	12,9 (+)	6,52	13	41,1	63	19,9	31,6	404
Tag 126	22	35 (+)	11,27 (+)	7	17,8	9,6	11,2	5,9	12,4	39,6	67,1	21	31,3	475
Tag 161	23	28	2,36	< 5	2	2,8	6,9	6	12	37,9	63,2	20	31,7	429
Kaninchen 13														
Tag -1	40 (-)	19	1,89	6	18,1	3	8,7	7,1 (+)	14	44	62	19,7	31,9	263
Tag 7	128 (+)	76 (+)	11,99 (+)	7	89,3 (+)	5,9	8,2	7,08	13,4	42,7	60,3	18,9	31,4	526
Tag 35	153 (+)	108 (+)	51,23 (+)	8	125,3 (+)	7,9	10,1	5,6	12,1	36,9	65,9	21,6	32,8 (+)	419
Tag 63	69 (+)	39 (+)	20,59 (+)	6	16,9	2,9	7,5	5,43	11,4	35 (-)	64,5	21	32,6 (+)	425
Tag 91	44	30 (+)	19,48 (+)	7	57,3	3,3	9,6	6,04	12,6	39,5	65,4	20,9	31,9	442
Tag 126	44	38 (+)	20,54 (+)	9	67,6 (+)	2,7	12 (+)	6,84	14,3	44	64,3	20,9	32,5	482
Tag 161	34	24	7,67 (+)	10	7,3	< 2	5,2	5,85	12,2	38,2	65,3	20,9	31,9	467
Kaninchen 14														
Tag -1	65	15	2,78 (+)	12	58,4 (++)	3	8,7	7,9 (+)	15	48	60	19,0 (-)	31,6	310
Tag 7	33	22	23,52 (+)	7	9,1	4,7	9,3	6,98	13,6	42,1	60,5	19,5	32,3 (+)	341
Tag 35	54	28	89,64 (+)	7	84,6 (+)	< 2	10,7	6,31	13,4	41,1	65,1	21,2	32,6 (+)	454
Tag 63	29	16	38,38 (+)	< 5	32,4	< 2	13 (+)	6,06	12,5	39,3	64,9	20,6	31,8	322
Tag 91	32	22	45,07 (+)	< 5	110,80 (+)	2,1	13,5 (+)	5,97	12,5	38,7	64,8	20,9	32,3 (+)	359
Tag 126	34	22	33,98 (+)	26 (+)	266 (+)	2,1	11,1	4,7 (-)	8,6 (-)	29,6 (-)	63	18,3	29,1 (-)	634
Tag 161	29	17	11,4 (+)	11	13,3	< 2	6,2	4,98 (-)	10,1 (-)	33,2 (-)	66,7	20,3	30,4	507
Kaninchen 15														
Tag -1	58	29	2,28	11	24 (++)	9	7,7	8,4 (+)	17,0 (+)	54 (+)	64	20,2	31,5	483
Tag 7	41	33 (+)	24,35 (+)	21 (+)	35,7	6,3	9,6	6,72	13,3	41,3	61,5	19,8	32,2 (+)	436
Tag 35	31	24	41,21 (+)	< 5	73,7	< 2	8,9	5,23 (-)	11,7	35,6 (-)	68,1	22,4 (+)	32,9 (+)	418
Tag 63	31	15	16,03 (+)	8	31,6	2,2	10,8	5,49	12,1	38,3	69,8	22	31,6	378
Tag 91	31	21	17,59 (+)	8	42,2	3,7	11,6	5,76	12,4	38,6	67	21,5	32,1 (+)	462
Tag 126	37	20	8,81 (+)	10	34,5	3,2	7,2	5,97	13,1	40,1	67,2	21,9	32,7 (+)	425
Tag 161	27	14	0,67	7	2,8	< 2	3,4	5,69	12,6	39,4	69,2	22,1 (+)	32	449

Tag der Blutentnahme														Thrombozyten
ALT	AST	Cholesterin	γ-GT	SGS	GLDH	Leukozyten	Erythrozyten	Hb	Hkt	MCV	MCH	MCHC		
Kaninchen 22														
Tag -1	29 (-)	1,33	7	42,2(++)	3	9,6	7,1(+)	14,4	45	64	20,3	32,0	396	
Tag 7	27	3,96(+)	7	29,7	2,7	6,3	6,7	12,7	41,5	61,9	19	30,6	593	
Tag 35	25	46,1(+)	5	56,3	6,6	8,1	4,89 (-)	10,5 (-)	31,7 (-)	64,8	21,5	33,1 (+)	498	
Tag 63	19	14,56(+)	<5	3,3	<2	6,4	5,53	11,2 (-)	35,7 (-)	64,6	20,3	31,4	411	
Tag 91	43	17,22 (+)	5	61,5	2,6	9,9	6,1	12,5	39,1	64,1	20,5	32	318	
Tag 126	30	9,45(+)	5	24	4,7	9,9	5,91	12,6	41,1	69,5	21,3	30,7	579	
Tag 161	28	<0,52	7	7,6	<2	4,9	5,43	11,1 (-)	35,8 (-)	65,9	20,4	31	527	
Kaninchen 23														
Tag -1	94	1,50	23 (+)	74,8(++)	22	9,9	7,3 (+)	15,3 (+)	45	63	21,1	33,7	344	
Tag 7	39 (+)	31,91 (+)	11	40,2	<2	12 (+)	7,42	14,9	45,9	61,9	20,1	32,5 (+)	520	
Tag 35	50	87,67 (+)	9	166,2 (+)	43 (+)	13,2 (+)	5,06 (-)	12,3	33,9 (-)	67	24,3 (+)	36,3 (+)	328	
Tag 63	29	20,33 (+)	6	11,1	<2	5,5	4,41 (-)	9,8 (-)	29,5 (-)	66,9	22,2 (+)	33,2 (+)	300	
Tag 91	42	43,9 (+)	10	118,3 (+)	2,5	11,8	6,2	13,5	40,2	64,8	21,8	33,6 (+)	410	
Tag 126	48	14,09 (+)	10	46,1	4	12,7 (+)	6,13	13,8	40,5	66,1	22,5 (+)	34,1 (+)	486	
Tag 161	21	0,57	<5	7,5	<2	5,9	6,09	13,2	40,1	65,8	21,7	32,9 (+)	388	
Kaninchen 24														
Tag -1	57	1,44	7	11,7	5	5,4 (-)	7,0	14,5	44	62	20,6	33,3	326	
Tag 7	50	28,59 (+)	11	67,5	13,1	8	6,28	12,8	41,1	65,4	20,4	31,1	576	
Tag 35	61	52,78 (+)	10	7,7	<2	4,7	5,34 (-)	12,4	35,8 (-)	67	23,2 (+)	34,6 (+)	585	
Tag 63	38	10,36 (+)	6	6,4	3,5	11,7	5,8	12,8	39,2	67,6	22,1 (+)	32,7 (+)	326	
Tag 91	Euthanasiert an Tag 64													
Kaninchen 25														
Tag -1	131 (+)	1,11	9	27,8(++)	15	11,2	6,9	14,6	45	66	21,2	32,3	334	
Tag 7	57	7,3 (+)	10	24,4	4,7	13,5 (+)	7,15	14,5	45,6	63,8	20,3	31,8	326	
Tag 35	74 (+)	35,22 (+)	9	79,6 (+)	9,7	12,2 (+)	5,73	13,1	40,1	70	22,9 (+)	32,7 (+)	493	
Tag 63	48	20,98 (+)	7	28,1	<2									
Tag 91	25	58,66 (+)	23 (+)	411,8 (+)	8,9	19,4 (+)	2,37 (-)	6,6 (-)	22,4 (-)	94,5 (+)	27,8 (+)	29,5 (-)	308	
Kaninchen 26														
Tag -1	49	2,83 (+)	9	10,7	3	14,6 (+)	7,1 (+)	15,0	47	66	21,0	32,1	208	
Tag 7	41	17,82 (+)	10	18,2	3,3	16,9 (+)	7,32	14,4	46,7	63,8	19,7	30,8	550	
Tag 35	189 (+)	66,67 (+)	12	24,2	16,6	10,3	5,62	12,6	36,3	64,6	22,4 (+)	34,7 (+)	366	
Tag 63	61	14,06 (+)	8	11,5	2,3	8,5	6,54	14,2	43,5	66,5	21,7	32,6 (+)	312	
Tag 91	48	15,51 (+)	7	33,9	<2	7	5,9	12,7	38,3	64,9	21,5	33,2 (+)	327	

	Tag der Blutentnahme	ALT	AST	Cholestein	γ-GT	SGS	GLDH	Leukozyten	Erythrozyten	Hb	Hkt	MCV	MCH	MCHC	Thrombozyten
Kaninchen 27	Tag -1	43 (-)	17	1,22	8	5,6	3	10,2	7,3(+)	15,5(+)	47	65	21,2	32,8	180
	Tag 7	26	26	23,96(+)	9	27,4	<2	8,6	5,73	13,1	38,1	66,5	22,9(+)	34,4(+)	339
	Tag 35	84(+)	67(+)	37,48(+)	<5	71	14,6	10,5	6,08	13,5	40	65,8	22,2(+)	33,8(+)	319
	Tag 63	38	24	14,53(+)	<5	8,3	2,8	7,4	5,89	13,2	39,3	66,7	22,4(+)	33,6(+)	329
	Tag 91	37	31(+)	9,97(+)	6	18,4	3,8	10,9	6,89	15,2	45,4	65,9	22,1(+)	33,5(+)	396
	Tag 126	52	25	4,71(+)	11	6,5	3,5	8,1	6,74	14,6	44,7	66,3	21,7	32,7(+)	335
Kaninchen 28	Tag 161	32	23	<0,52	5	18,3	<2	4,6	6,01	13,5	40,9	68,1	22,5(+)	33(+)	274
	Tag -1	67	19	1,72	8	24(++)	6	8,6	6,9	14,6	45	66	21,2	32,4	255
	Tag 7	43	19	8,47(+)	7	17,5	43,1(+)	4,7	6,38	14,1	42,1	66	22,1(+)	33,5(+)	435
	Tag 35	40	38(+)	59,36(+)	6	115	3,8	11,5	6,14	14,3	40,6	66,1	23,3(+)	35,2(+)	399
	Tag 63	34	16	17,56(+)	7	14,8	<2	7,9	5,61	12,6	38	67,7	22,5(+)	33,2(+)	378
	Tag 91	36	21	35,61(+)	10	44,7	3	10,4	6	13,2	39,1	65,2	22	33,8(+)	208
Kaninchen 29	Tag 126	34	21	17,48(+)	25(+)	44,5	3,4	9,6	5,77	13,2	40,9	70,9(+)	22,9(+)	32,3(+)	556
	Tag 161	29	19	4,27(+)	12	9,1	3,8	7,8	5,63	12	38,1	67,7	21,3	31,5	310
	Tag -1	60	17	3,50(+)	9	46,3(++)	5	10,0	7,3(+)	15,5(+)	49	66	21,1	32,0	202
	Tag 7	50	28	26,52(+)	7	60,7	38,4(+)	6,1	6,17	14,1	41,4	67,1	22,9(+)	34,1(+)	407
	Tag 35	97(+)	67(+)	50,43(+)	6	65,2	9,6	9,8	5,9	13,6	39,9	67,6	23,1(+)	34,1(+)	394
	Tag 63	50	28	19,89(+)	6	15,9	2,6	8	6,65	14,4	44,6	67,1	21,7	32,3(+)	372
Kaninchen 30	Tag 91	49	29(+)	27,07(+)	7	96,5(+)	6	11,6	7,14	14,9	45,9	64,3	20,9	32,5(+)	451
	Tag 126	55	33(+)	43,41(+)	14(+)	116,6(+)	6,8	10,5	7,04	14,8	46,5	66,1	21	31,8	475
	Tag 161	35	29(+)	34,47(+)	28(+)	61	<2	6,7	4,8(-)	10,6(-)	33,6(-)	70	22,1(+)	31,5	349
	Tag -1	67	18	1,28	14	7,4	15	11,1	6,5	13,9	43	67	21,5	32,0	214
	Tag 7	66	42	15,75(+)	12	11,5	6,9	9,5	6,01	13,5	39,8	66,2	22,5(+)	33,9(+)	307
	Tag 35	77(+)	34(+)	33,54(+)	9	36,2	9,6	6,6	5,42	12,2	36,7	67,7	22,5(+)	33,2(+)	308
Kaninchen 31	Tag 63	39	17	11,37(+)	7	6,5	<2	11,1	6,36	14,1	42	66	22,2(+)	33,6(+)	395
	Tag 91	51	30(+)	13,39(+)	7	13,3	3,4	10,1	5,17(-)	11,6	37	71,6(+)	22,4(+)	31,4	419
	Tag 126	42	24	12,59(+)	15(+)	37,8	4,7	9,5	6,01	13,5	39,8	66,2	22,5(+)	33,9(+)	307
	Tag 161	34	18	1,61	7	3,1	<2	6,6	5,42	12,2	36,7	67,7	22,5(+)	33,2(+)	308
	Tag -1	29(-)	14	1,78	6	29,2(++)	3	8,4	6,7	13,8	43	64	20,7	32,2	313
	Tag 7	24	43	34,73(+)	6	31,2	7,6	10,1	6,77	14,5	42,9	63,4	21,4	33,8(+)	466
Kaninchen 32	Tag 35	27	36(+)	70,14(+)	6	136,1(+)	8	10,5	5,98	13,4	38,9	65,1	22,4(+)	34,4(+)	248
	Tag 63	17	12	13,36(+)	<5	7,1	<2	6,6	5,45	11,9	36	66,1	21,8	33,1(+)	448
	Tag 91	24	25	21,42(+)	5	38,6	2,1	6,2	6,5	13,9	41,3	63,5	21,4	33,7(+)	176(-)
	Tag 126	25	19	12,98(+)	11	16,6	<2	9,1	6,36	13,4	41,6	65,4	21,1	32,2(+)	489
	Tag 161	19	14	4,43(+)	6	9,9	<2	3,8	4,92(-)	10,7(-)	33(-)	67,1	21,7	32,4(+)	356

	Tag der Blutentnahme	ALT	AST	Cholesterin	γ-GT	SGS	GLDH	Leukozyten	Erythrozyten	Hb	Hkt	MCV	MCH	MCHC	Thrombozyten
Kaninchen 39	Tag -1	31	20	0,83	5	29,6	5,4	7,1	6,62	14,2	44,1	66,6	21,5	32,2 (+)	370
	Tag 7	12	17	28,28 (+)	<5	42,6	<2	6,4	5,41	11,9	36,1	66,7	22	33 (+)	539
	Tag 35	41	67 (+)	69,85 (+)	7	45	21,2 (+)	10,7	4,93 (-)	12,1	34,9 (-)	70,8 (+)	24,5 (+)	34,7 (+)	436
	Tag 63	16	21	9,63 (+)	<5	10,2	<2	7,6	5,62	13,2	40,6	72,2 (+)	23,5 (+)	32,5 (+)	322
	Tag 91	16	21	6,11 (+)	<5	3,9	<2	5,7	5,56	13,1	39,3	70,7 (+)	23,6 (+)	33,3 (+)	352
Kaninchen 40	Tag -1	28	19	2,67 (+)	7	17,7	2,7	8,7	7,46	15,4	47,9	64,2	20,6	32,2 (+)	456
	Tag 7	25	22	56,8 (+)	5	8,9	3,7	7,9	6,05	13,7	39,4	65,1	22,6 (+)	34,8 (+)	613
	Tag 35	26	44 (+)	99,97 (+)	11	77,4	17,9	13,2 (+)	6,36	14,5	41	64,5	22,8 (+)	35,4 (+)	413
	Tag 63	26	44 (+)	28,08 (+)	<5	15,8	4,8	9,8	5,97	13,1	39,9	66,8	21,9	32,8 (+)	382
	Tag 91	20	46 (+)	38,64 (+)	8	43,8	13,9	7,8	5,02 (-)	10,9 (-)	33,7 (-)	67,1	21,7	32,3 (+)	253

XIII DANKSAGUNG

Zuallererst gilt mein Dank meinem Mentor, Professor Dr. Michael Joner. Danke, dass ich dieses spannende Projekt mit dir machen und dabei so viel von dir lernen durfte. Du warst trotz deines stressigen Klinikalltags jederzeit für mich da und ein toller Chef.

Bei Professor Dr. Hirschberger bedanke ich mich für Betreuung und Einreichung dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät.

Großer Dank geht an PD Dr. Christine Baumgartner, Leiterin des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum rechts der Isar, für die Durchführung der Stentimplantationen und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Aber auch bei allen anderen Mitarbeitern des ZPF möchte ich mich bedanken. Sie waren immer für mich da, hatten ein offenes Ohr und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Ohne Sie wäre diese Studie nicht so erfolgreich verlaufen. Besonderen Dank schulde ich Dr. Johannes Fischer.

Jan-Philip Hahn danke ich herzlich für die tollen Bildaufnahmen, die er für mich angefertigt und zur Verfügung gestellt hat. Seine Bilder bereichern diese Arbeit.

Für Ihre Unterstützung im Rahmen der OCT-Untersuchungen danke ich außerdem Dr. Petra Hoppmann.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Stolze und Herrn Dr. Richter und ihrem Team von LLS Rowiak LaserLabSolutions GmbH für die tolle Zusammenarbeit und das Einbetten, Schneiden und Färben meiner histologischen Präparate.

Auch bei Dr. Katja Steiger, Tierärztliche Leiterin der CeP am Klinikum rechts der Isar, und ihrem Team möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung bedanken.

Dem medizinischen Lektor Werner Winheim danke ich für das schnelle und gründliche Korrekturlektorat meiner Dissertationsschrift.

Lieben Dank an meine Kollegen und Freunde Maria Isabel Castellanos, Philipp Nicol, Magdalena Stöger, Simone Obermeier, Jonas Lewerich, Anna Lena Lahmann und Tobias Koppa für die herzliche Zusammenarbeit und die Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich hier auch bei Carina Lorenz dafür bedanken, dass Sie sich mit solchem Einsatz und Liebe um meine Kaninchen gekümmert hat und wir so ein tolles Team waren. Danke, dass du nicht nur die beste Tierpflegerin der Welt, sondern auch eine tolle Freundin geworden bist.

Auch meiner Familie möchte ich von ganzem Herzen Danke sagen. Dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben, mir das Tiermedizinstudium und diese Dissertation ermöglicht und mich so manches Mal auch seelisch und moralisch wieder aufgebaut haben. Ohne Sie hätte ich es nicht bis hierhin geschafft. Dafür, dass er unerschütterlich an meiner Seite steht, mich durch Höhen und Tiefen begleitet, auch meine schlechten Stimmungen erträgt und mich wieder zum Lachen bringt, danke ich aus tiefstem Herzen Sebastian Schmidt.